



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**EFEITO DA SALINIDADE, DENSIDADE DE ESTOCAGEM E DA INFECÇÃO  
HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHN) NA IMUNIDADE DO  
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM FAZENDAS DO RIO  
GRANDE DO NORTE**

**Lígia Garcia Reis**

**ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina de Fátima dos Santos Braz**

**NATAL / RN  
2008**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Lígia Garcia Reis**

**EFEITO DA SALINIDADE, DENSIDADE DE ESTOCAGEM E DA INFECÇÃO  
HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHHN) NA IMUNIDADE DO  
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM FAZENDAS DO RIO  
GRANDE DO NORTE**

ORIENTADOR: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina de Fátima dos Santos Braz

Departamento de Microbiologia e Parasitologia / CB / UFRN

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos à obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração: Biologia Estrutural e Funcional.

NATAL / RN  
Setembro de 2008

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Reis, Lígia Garcia.

Efeito da salinidade, densidade de estocagem e da infecção hipodermal e necrose hematopoiética (IHHN) na imunidade do camarão *Litopenaeus vannamei* cultivados em fazendas do RN / Lígia Garcia Reis. – Natal, RN, 2008.

70 f. : il.

Orientador: Regina de Fátima dos Santos Braz. Maurício Pereira de Sales.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

1. Camarão – Criação – Dissertação. 2. Camarão – Saúde – Dissertação. 3. Salinidade – Dissertação. I. Braz, Regina de Fátima dos Santos. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BCZM  
(043.2)

CDU

639.512

**Lígia Garcia Reis**

**EFEITO DA SALINIDADE, DENSIDADE DE ESTOCAGEM E DA INFECÇÃO  
HIPODERMAL E NECROSE HEMATOPOIÉTICA (IHN) NA IMUNIDADE DO  
CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM FAZENDAS DO RIO  
GRANDE DO NORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Biociências, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos à obtenção de título de Mestre em Ciências, área de concentração: Biologia Estrutural e Funcional.

**Aprovada em:**        /        /

**Banca Examinadora**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina de Fátima dos Santos Braz**  
**UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte**

---

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cibele Soares Pontes**  
**UFESA – Universidade Federal do Semi Árido**

---

**Prof<sup>º</sup>. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins**  
**UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que sempre me orientou e iluminou para que pudesse, com todas as dificuldades, atingir o meu objetivo.

A orientadora professora Regina Braz pela sua paciência, companheirismo, pela oportunidade e amizade. Muito obrigada!

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Parasitologia que de uma forma ou de outra contribuíram na elaboração deste trabalho.

A Címária, pela sua amizade, carinho, companheirismo, paciência e valioso apoio em vários momentos de minha vida pessoal e acadêmica.

À minha família, mãe, pai e irmã pelas pessoas maravilhosas que são. Obrigada pelo amor e apoio incondicional.

Aos meus avôs e padrinhos, que mesmo longe me deram muita força e apoio. Amo vocês!

Ao meu “namorado” Cláudio, pessoa que admiro, amo muito e um dos responsáveis pelo meu crescimento pessoal e profissional, e que está ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Aos amigos e familiares por entenderem minhas constantes ausências.

Aos amigos da faculdade, pessoas maravilhosas que mesmo distantes me apoiaram e incentivaram ao longo dessa fase.

A família Rocha, que me acolheram e me apoiaram.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

- WSSV – vírus da mancha branca (White Spot Syndrome Vírus)
- TSV – vírus da síndrome de Taura (Taura Syndrome Virus)
- IHHNV – vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus)
- IMNV – vírus da mionecrose infecciosa (Myonecrosis Infectious Vírus)
- IHHN – Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética
- RDS – síndrome da deformidade do rosto (Runt Deformity Syndrome)
- NHP – hepatopancreatite necrosante
- HH – hemócitos hialinos
- HGP – hemócitos semi-granulares ou granulares pequenos
- HGG – hemócitos granulares ou granulares grandes
- proPO – Sistema profenoloxidase
- EAO – espécies ativas de oxigênio
- PAM – peptídeos antimicrobianos
- PO – enzima fenoloxidase
- ppA – enzima ativadora de profenoloxidase
- TGase – enzima transglutaminase dependente de cálcio
- PC – proteína de coagulação
- THC – contagem total de hemócitos (total hemocyte count)
- AA – atividade aglutinante
- TC – tempo de coagulação
- PCR – reação de polimerase em cadeia
- ml – mililitro
- μL – microlitro
- mm – milímetro
- MAS – solução Alsever modificada (solução anticoagulante)
- mM – milimolar
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético de sódio
- mm<sup>3</sup> – milímetro cúbico
- pH – potencial hidrogeniônico
- M – molar
- g - gramas

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1:</b> <i>Litopenaeus vannamei</i> .	11
<b>Figura 2:</b> Tipos de hemócitos (A-F): A, D: hemócitos hialinos (HH); B, E: hemócitos com grânulos pequenos (HGP); C, F: hemócitos com grânulos grandes (HGG). Hemócitos de camarões observados ao microscópio de contraste de fase e eletrônico de transmissão, respectivamente.	18
<b>Figura 3:</b> Reações celulares de defesa em crustáceos (H - I) H: encapsulamento in vitro do nematóide <i>Panagrellus redivirus</i> por hemócitos de <i>M. rosenbergii</i> ; I: encapsulamento in vitro de hifas do fungo <i>Ganoderma</i> sp por hemócitos de <i>F. paulensis</i> , com forte reação de melanização.	19
<b>Figura 4:</b> Mecanismos microbicidas utilizados pelos hemócitos de crustáceos durante o processo de fagocitose de microrganismos.	20
<b>Figura 5:</b> Liberação para o plasma de diferentes efetores imunológicos (lectinas, enzima profelonoxidase, serino protease, peptídeos antimicrobianos, enzima transglutaminase) pelos grânulos dos hemócitos de crustáceos, após sua ativação por componentes da superfície de microrganismos.	22
<b>Figura 6:</b> Localização das fazendas de camarão <i>L. vannamei</i> nos municípios do Estado do Rio Grande do Norte (1: Guamaré; 2: São Bento do Norte; 3: Ceará-Mirim; 4: Nísia-Floresta; 5: Tangará; 6: Canguaretama).	28
<b>Figura 7:</b> Anatomia externa de um camarão peneídeo.	30
<b>Figura 8:</b> Coleta de hemolinfa e avaliação do tempo de coagulação.	34



## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>RESUMO</b>	8
<b>ABSTRACT</b>	9
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 Aspectos relacionados a carcinicultura	10
1.2 Fatores de risco associados à saúde dos camarões	13
1.3 Sistema imune dos crustáceos	15
1.3.1 Resposta imune celular	17
1.3.1.1 Hemócitos	17
1.3.1.2 Fagocitose, formação de nódulos e cápsulas	18
1.3.1.3 Produção de espécies ativas de oxigênio (EAO)	20
1.3.2 Resposta imune humoral	21
1.3.2.1 Moléculas de reconhecimento	21
1.3.2.2 Lectinas	22
1.3.2.3 Sistema profenoloxidase (proPO) e formação de melanina	23
1.3.2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAM)	24
1.3.2.5 Sistema de coagulação e cicatrização de feridas	25
1.4 Técnicas indicadoras do estado de saúde do camarão	25
<b>2. OBJETIVOS DA PESQUISA</b>	27
2.1 Objetivo geral	27
2.2 Objetivos específicos	27
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	28
3.1 Área de estudo	28
3.2 Coleta de animais	29
3.3 Descrição e taxonomia da espécie em estudo	29
3.4 Extração de DNA e PCR para detectar a presença de IHHNV em camarões	30
3.4.1 Coleta de pleópodos e extração de DNA	30
3.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Eletroforese	31
3.5 Coleta de hemolinfa e análise de parâmetros hemato-imunológicos	32
3.5.1 Contagem total de hemócitos (THC)	32
3.5.2 Determinação da atividade aglutinante (AA)	33
3.5.3 Determinação do tempo de coagulação (TC)	34

3.6 Análise estatística dos dados	34
<b>4. RESULTADOS</b>	35
<b>Artigo I</b>	36
<b>5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	63

## RESUMO

O principal problema enfrentado pela indústria do camarão são as enfermidades de origem infecciosa. A Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) é uma das principais causas de doenças no camarão de cultivo *Litopenaeus vannamei*. Alterações do ambiente de cultivo envolvendo qualidade da água, concentração de oxigênio, salinidade, temperatura, densidade de estocagem, presença de patógenos, entre outros, desencadeiam uma situação de estresse nos camarões cultivados, debilitando-os e permitindo a instalação de enfermidades. O estresse desencadeia no animal a alteração de moléculas componentes da resposta imune, que podem ser usadas como indicadores de saúde do camarão. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da salinidade, densidade de estocagem e infecção pelo IHHNV na imunidade do camarão de cultivo *L. vannamei*. Os parâmetros imunes utilizados para monitorar as condições de saúde dos camarões foram o número total de hemócitos (THC), a atividade aglutinante (AA) e o tempo de coagulação (TC) dos soros dos camarões. Estes parâmetros foram analisados em camarões saudáveis e infectados pelo IHHNV, cultivados em baixa (0-0,5 ‰), média (19-24 ‰) e alta (>38 ‰) salinidades e em extensiva (7-12 cam.m<sup>-2</sup>), semi-intensiva (15-25 cam.m<sup>-2</sup>) e intensiva (33-45 cam.m<sup>-2</sup>) densidades de estocagem. A taxa de infecção pelo IHHNV foi significativamente maior em baixa salinidade ( $P < 0,005$ ) e na densidade intensiva ( $P < 0,005$ ), ambas condições estressantes para o *L. vannamei*. Baixa salinidade significativamente aumentou THC ( $P < 0,05$ ) e diminuiu TC ( $P < 0,05$ ) de camarões saudáveis e infectados, mas AA ( $P < 0,05$ ) de camarões saudáveis diminuiu significativamente na média salinidade. A intensificação do cultivo não afetou THC, AA e TC de camarões saudáveis e infectados ( $P > 0,05$ ). A infecção pelo IHHNV não afetou nenhum dos parâmetros imunes dos camarões cultivados nas diferentes salinidades e densidades de estocagem. É necessário enfatizar que o presente estudo foi realizado em camarões cultivados em viveiros, onde vários fatores ambientais estão atuando simultaneamente. Desta forma, são necessários estudos adicionais sobre a influência de outros fatores ambientais nos parâmetros imunes de camarões nas condições de cultivo.

Palavras-chaves: *Litopenaeus vannamei*; Viveiros; IHHNV; Salinidade; Densidade de estocagem; Contagem total de hemócitos; Atividade aglutinante; Tempo de coagulação

## ABSTRACT

The main problem faced by the shrimp industry are the infectious diseases. The hypodermal and hematopoietic necrosis infection (IHHN) is one of the major cause of disease in the cultured shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Environmental changes involving water quality, oxygen concentration, salinity, temperature, stocking density, presence of pathogens, among others, triggering a stressing condition for the cultured shrimp, weakening them and allowing the outbreak of diseases. The stress on the animal leads to a change in the molecules immune response components, which can be used as indicators of shrimp health. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of salinity, stocking density and IHHNV infection on the *L. vannamei* shrimp. The immune parameters used to check the shrimp health were the total hemocytes counts (THC), the agglutinating activity (AA) and the clotting time (CT) of the serum of shrimp. These parameters were analyzed in healthy and IHHNV-infected shrimp, grown in low (0-0.5 ‰), medium (19-24 ‰) and high (> 38 ‰) salinity, and extensive (7-12 cam.m<sup>-2</sup>), semi-intensive (15-25 cam.m<sup>-2</sup>) and intensive (33-45 cam.m<sup>-2</sup>) stocking density. The IHHNV infection rate was significantly higher in low salinity ( $P<0.005$ ) and intensive density ( $P<0.005$ ), both stressful conditions for *L. vannamei*. Low salinity significantly increased THC ( $P<0.05$ ) and decreased and CT ( $P<0.05$ ) in healthy and infected shrimp, but AA ( $P<0.05$ ) significantly decreased in healthy shrimp at medium salinity. Culture intensification did not affect the THC, AA and CT of healthy and infected shrimp ( $P>0.05$ ). The IHHNV infection did not affect any immune parameters of shrimp cultured at different salinities and stocking densities. It is necessary to emphasize that this study was conducted in shrimp grown in ponds, where several environmental factors are acting simultaneously. Thus, further studies are needed about the influence of other environmental factors on the immune parameters of shrimp cultured in pond.

*Keywords:* *Litopenaeus vannamei*; Ponds; IHHNV; Salinity; Stocking density; Total hemocyte counts; Agglutinating activity; Clotting time

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS RELACIONADOS A CARCINICULTURA

O cultivo de camarões marinhos é, hoje em dia, o segmento mais rentável da aquicultura (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001b; MARTINS, 2003). O hemisfério oriental é responsável pela maior produção mundial dos camarões cultivados, tendo destaque os países do sudoeste asiático como China, Tailândia, Vietnã, Indonésia, Índia, Bangladesh e Malásia. No hemisfério ocidental, o Brasil vem merecendo destaque internacional pela sua produtividade, consolidando em 2003 a posição de sexto maior produtor de camarões cultivados do mundo, superando países como Equador e o México, que tradicionalmente ocupavam o primeiro e o segundo lugar, respectivamente (ROCHA, 2000; ROCHA; RODRIGUES; LEITE, 2004).

Entre as espécies de camarão mais cultivadas no Ocidente está o *Litopenaeus vannamei*, crustáceo da ordem Decapoda pertencente à família Penaeidae. Este crustáceo, também conhecido, como “camarão cinza do Ocidente” é nativo da costa americana do Pacífico que se estende desde o Peru até o México, mostrando acentuada incidência na faixa costeira do Equador (BROCK; MAIN, 1994; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001a; MARTINS, 2003). No Brasil, a introdução do camarão da espécie *Litopenaeus vannamei*, aconteceu durante a década de 80. Em pouco tempo, essa espécie demonstrou seu elevado grau de rusticidade, alta capacidade de adaptação e crescimento em diferentes condições ambientais, apresentando níveis de produtividade e competitividade muito superiores aos alcançados com as demais espécies até então cultivadas no país, além da excelente qualidade da carne e boa aceitação no mercado (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001a) (Figura 1).

A carcinicultura marinha é, atualmente, uma das atividades econômicas da aquicultura mais dinâmica da região Nordeste do Brasil. O Rio Grande do Norte (RN) oferece condições excepcionais para o crescimento sustentável da criação e produção de camarões. Além da disponibilidade de área adequada e da temperatura com variação anual em torno de 22°C a 30°C, o Estado apresenta água de boa qualidade, mão-de-obra abundante e localização geográfica estratégica em relação aos mercados externos (OLIVEIRA *et al.*, 2003). De acordo com os dados da ANCC (Associação Norte-rio-grandense dos Criadores de Camarão) e do IDEMA (Instituto de Desenvolvimento do Meio Ambiente) em 2005, o RN produziu 25 mil toneladas do camarão *Litopenaeus vannamei*, e manteve-se como líder no ranking brasileiro das exportações.



**Figura 1:** *Litopenaeus vannamei*.  
Fonte: NUNES, 2004.

O desempenho da carcinicultura pode ser afetado por uma série de fatores não apenas econômicos, mas também pelo surgimento de enfermidades que são desencadeadas quando ocorre um desequilíbrio entre as condições ambientais do viveiro, o estado de saúde dos camarões e os agentes potencialmente patogênicos (BROCK; MAIN, 1994; LIGHTNER; REDMAN, 1998; KAUTSKY *et al.*, 2000; NUNES; MARTINS, 2002; MERCIER *et al.*, 2006). Sob uma situação de desequilíbrio no cultivo os camarões são submetidos a uma condição de estresse, gerando uma alteração em seu estado imunológico. Nestas circunstâncias, a população cultivada torna-se susceptível ao ataque de patógenos levando os indivíduos à debilitação ou a morte (SNOWDON, 1999; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; WICKINS; O' C LEE, 2002).

Inúmeros fatores ambientais podem causar estresse nos camarões, tais como extremos de pH e temperatura, concentrações baixas de oxigênio dissolvido, saturação de gases, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias tóxicas, incluindo metais pesados e pesticidas (BROCK; MAIN, 1994; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; HERNÁNDEZ; NUNES, 2001; MORE; FRELIER, 2002; NUNES; MARTINS, 2002; CHENG *et al.*, 2003; MERCIER *et al.*, 2006). Além desses, fatores bióticos como a densidade de estocagem, propagação de bactérias oportunistas, proliferação de protozoários, aquisição de pós-larva com carga viral e a presença excessiva de microalgas, também podem comprometer o estado imunológico dos camarões tornando-os mais vulneráveis às doenças (NUNES; MARTINS, 2002).

Nos últimos anos as doenças infecciosas, de etiologia viral e bacteriana, representaram um importante obstáculo econômico para a carcinicultura marinha, causando sérios danos à indústria, influenciando a produção e a expansão das áreas de cultivo (KAUTSKY *et al.*, 2000; HERNÁNDEZ; NUNES, 2001; NUNES; MARTINS, 2002; WICKINS; O'C LEE, 2002; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; MERCIER *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2006). No Brasil, quatro grupos de vírus em particular têm causado grandes problemas em fazendas de camarão: o vírus da mancha branca (WSSV), vírus da síndrome de Taura (TSV) e o vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) (WICKINS; O'C LEE, 2002) e recentemente, um novo vírus denominado de Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) foi encontrado em fazendas da Região Nordeste. O surgimento desse vírus coincidiu com um período de elevada pluviometria, o que ocasionou mudanças na temperatura e qualidade da água do cultivo (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; ANDRADE; LIGHTNER; ROCHA, 2006).

A Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHN) é uma das principais causas de doenças no cultivo de peneídeos. O IHHNV é um vírus pequeno, icosaédrico, não-envelopado contendo um DNA linear fita simples (ssDNA) com o genoma de 4,1Kb, pertencente a família Parvoviridae (BONAMI *et al.*, 1990; TANG; LIGHTNER, 2001; MOTTE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007). Em *L. vannamei*, este vírus pode manter-se na forma latente ou provocar doença sintomática com a diminuição da taxa de consumo de alimento, canibalismo (DHAR; ROUX; KIMPEL, 2001), acentuada redução no tamanho e perda de equilíbrio, deformação do rosto, antenas tortas ou queimadas e exoesqueleto em forma de sela de cavalo, características da síndrome conhecida por RDS (Runt Deformity Syndrome) (NUNAN; POULOS; LIGHTNER, 2000; DHAR; ROUX; KIMPEL, 2001; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001a; YANG *et al.*, 2007). O IHHNV não possui um órgão alvo, dessa forma, produz patogenias não específicas e pode ocorrer complicação por infecção secundária (NUNES; MARTINS, 2002; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001b).

As doenças bacterianas mais comuns das fazendas de camarão são as provocadas por algumas bactérias extracelulares gram-negativas do gênero *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* e *V. penaeicida*) e por bactérias intracelulares semelhantes a *Rickettsia*, que atacam o hepatopâncreas causando a hepatopancreatite necrosante (NHP). Muitas outras doenças bacterianas são de etiologia secundária com muitas espécies coexistindo de maneira benigna com os crustáceos até que condições estressantes os predisponem a patogenicidade bacteriana (BROCK; MAIN, 1994; KAUTSKY *et al.*, 2000; WICKINS; O'C LEE, 2002; NUNES; MARTINS, 2002). As bactérias do gênero *Vibrio*

habitam a matéria orgânica acumulada nos sedimentos e ficam em suspensão na coluna da água dos viveiros fazendo parte da flora normal como microrganismos decompositores. Em situações de estresse se tornam potencialmente patogênicas aos camarões (SANTOS *et al.*, 2005).

## 1.2 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS À SAÚDE DOS CAMARÕES

Em todas as manifestações de doenças ocorridas na carcinicultura pode ser feita uma relação direta entre o desenvolvimento de doenças e alterações dos fatores ambientais ou de qualidade da água que desencadeiam uma situação de estresse nos camarões cultivados, debilitando-os e permitindo a instalação de microrganismos patogênicos (FONSECA; ROCHA, 2004; SANTOS *et al.*, 2005). O estresse tem sido definido como uma condição na qual o equilíbrio dinâmico do organismo (homeostase) é ameaçado ou perturbado como resultado de estímulos estressores intrínsecos ou extrínsecos (MERCIER *et al.*, 2006).

O estresse desencadeia no animal a ativação de moléculas e respostas fisiológicas. Moléculas como glicose, lactato, hemocianina, proteínas totais, colesterol, fenoloxidase, ânion superóxido, entre outras, servem como indicadores de estresse e podem ser usadas para monitorar as condições fisiológicas de muitos crustáceos, inclusive dos camarões (LE MOULLAC *et al.*, 1998; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; MERCIER *et al.*, 2006).

Camarões cultivados são expostos diariamente a variações nos parâmetros físicos, químicos e biológicos dos viveiros, estão expostos a contaminantes tóxicos e sujeitos às práticas de manejo inadequadas (RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2000; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002; CHIM *et al.*, 2003; BORBA, 2004; DRAHOS, 2006). Tais fatores geram estresse no animal confinado, ocasionando alterações quantitativas e qualitativas nos componentes celulares e humorais do sistema imune do camarão, diminuição na taxa de crescimento e sobrevivência (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; TSENG; CHEN, 2004; LIU; CHEN, 2004; WANG; CHEN, 2005; MERCIER *et al.*, 2006).

A manutenção da qualidade da água do viveiro é essencial para o sucesso do cultivo, sendo a salinidade um dos parâmetros químicos mais importantes para o crescimento e desenvolvimento dos camarões (PONCE-PALAFOX; PALACIOS; ROSS, 1997; FONSECA; ROCHA, 2004; BORBA, 2004; CUESTA *et al.*, 2005; ROMANO; ZENG, 2006).

No cultivo, a melhor salinidade para uma espécie é aquela que se aproxima de seu ponto isosmótico, pois nessa condição não há gasto energético durante o processo de



osmorregulação, ficando a energia disponível para o crescimento, resposta imunológica e outras funções fisiológicas (CAVALCANTI; MACEDO; MONTES, 2005). O *L. vannamei* apresenta o ponto isosmótico em torno de 20 ‰, nessa salinidade observa-se um melhor crescimento e sobrevivência dos camarões juvenis (PONCE-PALAFOX; PALACIOS; ROSS, 1997; MCGRAW; SCARPA, 2004).

*Litopenaeus vannamei* é uma espécie eurihalina, tolerando amplas variações na salinidade (0-60 ‰). Esses peneídeos são potentes osmorreguladores, pois mantém a osmolalidade de sua hemolinfa hiper-osmótica em ambientes com baixos níveis de salinidade e hipo-osmótica em altos níveis de salinidade. (PONCE-PALAFOX; PALACIOS; ROSS, 1997; SANTOS *et al.*, 2005).

Apesar de *L. vannamei* ser eurihalino, mudanças abruptas na salinidade podem causar estresse, principalmente quando associado a práticas inadequadas de manejo, prejudicando diretamente o metabolismo, crescimento, muda, o sistema imune e a sobrevivência desse crustáceo (PONCE-PALAFOX; PALACIOS; ROSS, 1997; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002; VILLAREAL; HERNANDEZ-LLAMAS; HEWITT, 2003; CHIM *et al.*, 2003; BORBA, 2004; CUESTA *et al.*, 2005; ROMANO; ZENG, 2006). Essas variações acarretam um desequilíbrio iônico na água de cultivo e exige um maior gasto de energia pelo camarão para manter a osmorregulação adequada (homeostase), dessa forma, os animais ficam debilitados e susceptíveis aos agentes patogênicos (KAUTSKY *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005; PEREGRINO; ROCHA; ALENCAR, 2005; BRITO; CHIMAL; ROSAS, 2006).

Outro parâmetro químico crítico em cultivos semi-intensivos e principalmente intensivos é o oxigênio dissolvido, pois camarões submetidos a condições de hipóxia podem apresentar uma diminuição da resposta imune (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; JIANG; PAN; -BO, 2005). A solubilidade de oxigênio na água é influenciada inversamente pela temperatura, salinidade e pressão atmosférica. A necessidade de oxigênio dissolvido para camarões peneídeos variam conforme a espécie e tamanho do indivíduo. As concentrações de oxigênio dissolvido são dinâmicas, apresentando ciclos diários que variam com os processos de fotossíntese e respiração. Quando as concentrações de oxigênio forem inferiores a 2,5 mg.L<sup>-1</sup>, os processos de alimentação ou fertilização devem ser interrompidos e medidas de renovação de água e aeradores devem ser utilizados (BORBA, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

O risco de doenças parece aumentar em cultivos intensivos e, por conseguinte, com a densidade de camarões no viveiro (DRAHOS, 2006, JOHNSTON *et al.*, 2006). Na China, a ocorrência de doenças em viveiros de camarão está estreitamente associado com a excessiva

estocagem no cultivo e má qualidade da água. Nas Filipinas, a prevalência de IHHNV em populações de *Penaeus monodon* tem sido correlacionada com a intensificação do cultivo e o estado do mangue (KAUTSKY *et al.*, 2000). Dessa forma, o confinamento de animais aliado ao cultivo com altas densidades criam situações de estresse que propiciam o estabelecimento de doenças, da mesma forma que favorece a rápida transmissão de patógenos veiculada pela água (ARNOLD *et al.*, 2006).

No final dos anos 80, as doenças infecciosas tiveram um efeito devastador no cultivo de camarão marinho, causando o colapso na produção de grandes países produtores. A partir de então, as enfermidades passaram a ser vistas como um obstáculo econômico e uma ameaça à viabilidade da atividade (NUNES; MARTINS, 2002). O impacto econômico do IHHNV em fazendas de cultivo de *L. vannamei* fica entre 10 a 50 % quando comparada com fazendas livres dessa infecção. Nas fazendas o vírus pode ser transmitido horizontalmente, por meio da ingestão de indivíduos mortos (canibalismo) ou através do contato com água contaminada por animais infectados, ou verticalmente, pela transmissão direta para larvas, através da passagem do vírus para oócitos (LOTZ, 1997, LIGHTNER; REDMAN, 1998; MOTTE *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2007).

O risco do aparecimento de enfermidade novas ou emergentes no cultivo sempre estará presente, porém a dimensão do seu impacto dependerá da capacidade do produtor em controlar o estado de saúde dos camarões cultivados e adotar práticas de biossegurança e de manejo adequadas (FONSECA; ROCHA, 2004; ANDRADE; LIGHTNER; ROCHA, 2006).

### **1.3 SISTEMA IMUNE DOS CRUSTÁCEOS**

O sistema imune surgiu com o objetivo de proteger organismos multicelulares de substâncias estranhas. Durante a evolução, surgiu dois sistemas de defesa: a imunidade inata encontrada em todos os organismos multicelulares e a imunidade adquirida, encontrada apenas nos vertebrados (LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

O sistema imune inato é o mecanismo de defesa filogeneticamente mais antigo, constitui a primeira linha de defesa, que embora inespecífico reconhece padrões moleculares conservados presentes nos microrganismos, conferindo uma resposta rápida e eficiente, limitando dessa forma, as infecções nos estágios iniciais (RATCLIFFE, 1985; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; JORY; DUGGER, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; NUNES; MARTINS, 2002; WICKINS; O' C LEE, 2002).

A imunidade adaptativa é um mecanismo de defesa mais sofisticado, pois apresenta um vasto repertório de receptores específicos para o antígeno, além de gerar células de memória que conferem uma resposta mais rápida e eficiente na segunda exposição ao mesmo antígeno (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACCO, 2004).

Embora sejam desprovidos de uma imunidade específica, os crustáceos foram capazes de colonizar uma ampla variedade de habitats, muitas vezes repletos de patógenos, pois contam com o sistema de defesa inato, que embora, não possa produzir anticorpos e gerar memória imunológica, é eficaz no reconhecimento e destruição de patógenos (RATCLIFFE, 1985; MUTA; IWANAGA, 1996; JORY; DUGGER, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

O sistema imune inato dos crustáceos é mediado por reações celulares e humorais que estão intimamente relacionados ao seu sangue ou hemolinfa. A hemolinfa consiste de uma fração celular, representado pelos hemócitos, e de uma fração líquida constituída pelo plasma que contém fatores humorais dissolvidos (HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; BACHÈRE, 2000; BARRACCO, 2004).

Como primeira linha de defesa, os crustáceos contam com um exoesqueleto de quitina, que além de servir como estrutura de suporte, funciona como barreira física e mecânica protetora contra invasores microbiológicos, e também química, pois contém secreções mucosas que inibem ataques enzimáticos (RATCLIFFE, 1985; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; NUNES; MARTINS, 2002; WICKINS; O'C LEE, 2002; LEE; SÖDERHÄLL, 2002). Contudo, quando ocorre uma lesão na carapaça ou durante o processo de muda, microrganismos oportunistas ou patogênicos podem invadir o tecido e rapidamente estabelecer um processo infeccioso, uma vez que o sistema circulatório dos crustáceos é aberto (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; BACHÈRE, 2000; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001b; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; WICKINS; O'C LEE, 2002). Em seguida, moléculas presentes na hemolinfa reconhecem padrões moleculares conservados nos patógenos, acionando mecanismos de defesa celulares e humorais (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; BARBIERI; OSTRENSKY, 2001b; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; THEOPOLD *et al.*, 2004).

### 1.3.1 RESPOSTA IMUNE CELULAR

#### 1.3.1.1 Hemócitos

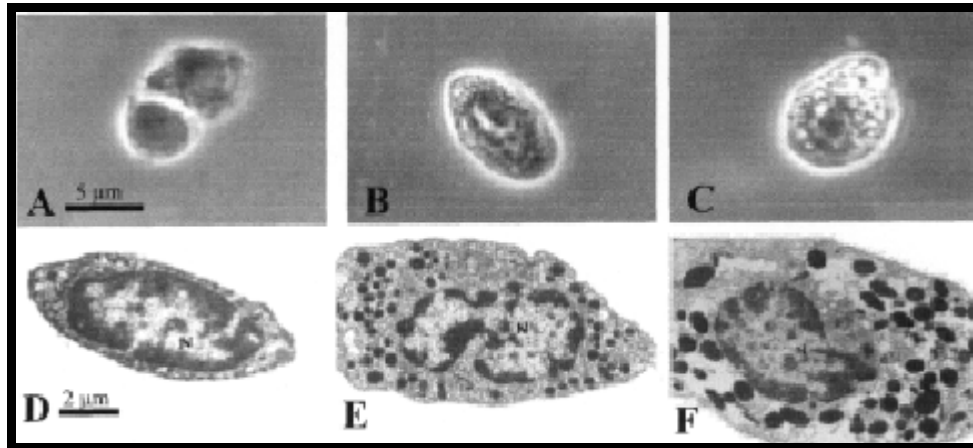
O primeiro processo imune consiste no reconhecimento de microorganismos invasores, mediado pelos hemócitos e pelas proteínas plasmáticas (VAN DE BRAAK; FABER; BOON, 1996; BACHÈRE, 2000; WICKINS; O'C LEE, 2002).

Os hemócitos têm papel central na iniciação e manutenção da resposta imune celular dos crustáceos e de outros invertebrados (JORY; DUGGER, 2000; BACHÈRE, 2000), cujas funções envolvem o reconhecimento do não próprio, a fagocitose, formação de nódulos, encapsulamento e destruição de patógenos pela produção e/ou liberação de moléculas tóxicas e microbicidas (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; VAN DE BRAAK; FABER; BOON, 1996; JOHANSSON *et al.*, 2000; BACHÈRE, 2000; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003). Além dessas funções participam do processo de cicatrização de feridas, iniciam o processo de coagulação através da liberação de fatores de gelificação do plasma, transportam e secretam na hemolinfa o sistema profenoloxidase (proPO) e as proteínas  $\alpha 2$  – macroglobulina, aglutininas e peptídeos antimicrobianos (RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; BACHÈRE, 2000; CHENG; CHEN, 2000).

Baseado em caracterizações morfológicas e citoquímicas, os crustáceos apresentam três tipos de hemócitos que desempenham diferentes funções na imunidade: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou granulares pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou granulares grandes (HGG) (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; BACHÈRE, 2000; CHENG; CHEN, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2000; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003, ZHANG; SHAO; KANG, 2006) (Figura 2).

Os HH são células pequenas, caracterizadas pela ausência de grânulos, estão envolvidos na fagocitose e na coagulação (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004). Os HGP contêm muitos grânulos pequenos arredondados, sendo os primeiros a degranular na resposta imune. Participam da fagocitose, da encapsulação e na liberação do sistema profenoloxidase (proPO), e peptídeos antimicrobianos (PAM) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003). Os HGG são células grandes, com grânulos grandes contendo peneidinas e componentes do sistema proPO

(SÖDERHÄLL, 1999; BACHÈRE, 2000; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004).



**Figura 2:** Tipos de hemócitos (A-F): A, D: hemócitos hialinos (HH); B, E: hemócitos com grânulos pequenos (HGP); C, F: hemócitos com grânulos grandes (HGG). Hemócitos de camarões observados ao microscópio de contraste de fase e eletrônico de transmissão, respectivamente.

Fonte: BARRACCO, 2004.

O número de hemócitos livres na hemolinfa pode variar, diminuindo bastante durante uma infecção, estresse ou muda, sendo necessária a produção de novos hemócitos pelo tecido hematopoiético prejudicando, entre outros fatores, a coagulação da hemolinfa. Inicialmente os hemócitos se apresentam como células não-diferenciadas e bastante labéis (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; JOHANSSON *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2005).

### 1.3.1.2 Fagocitose, formação de nódulos e cápsulas

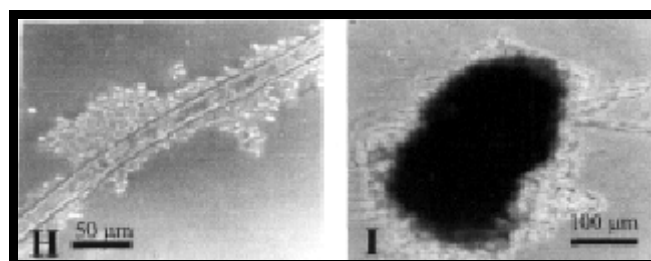
As reações de defesa mediada pelos hemócitos incluem a fagocitose, encapsulamento e formação de nódulos (Figura 3) (WICKINS; O'C LEE, 2002).

A fagocitose é um processo onde o agente invasor é inicialmente reconhecido, englobado por pseudópodes, interiorizado e destruído intracelularmente através de vários mecanismos degradativos e microbicidas. Como nos fagócitos dos vertebrados, os hemócitos dos crustáceos contêm estruturas semelhantes aos lisossomos, que se fundem com os vacúolos fagocíticos denominados fagossomo, formando o fagolisossomo, promovendo a degradação das partículas endocitadas. A eliminação destas partículas envolve a liberação de enzimas

degradativas dentro do fagolisossomo e a geração de espécies ativas de oxigênio (EAO) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; BARRACCO, 2004).

A formação de nódulos ocorre quando a cavidade corpórea do crustáceo é invadida por uma quantidade maciça de microorganismos. Nesse processo, os invasores são aprisionados por várias camadas de hemócitos (HGG e HGP) junto ao local da infecção, evitando dessa forma sua disseminação dentro do hospedeiro. Nas regiões mais centrais dos nódulos, observam-se geralmente sinais de fagocitose e de necrose celular (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004).

A encapsulação ocorre quando a partícula invasora é demasiadamente grande para ser fagocitada, assim os hemócitos granulares e semi-granulares dispõem-se em várias camadas, circundando o material estranho, com a função de imobilizá-lo e segregá-lo do hospedeiro. O encapsulamento ocorre geralmente contra helmintos, hifas de fungos ou determinadas formas de protozoários. Estas estruturas, cápsulas e nódulos, tornam-se excessivamente melanizadas em artrópodes devido a atividade da fenoloxidase, sendo os patógenos geralmente destruídos pela liberação de moléculas citotóxicas ou líticas (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004).

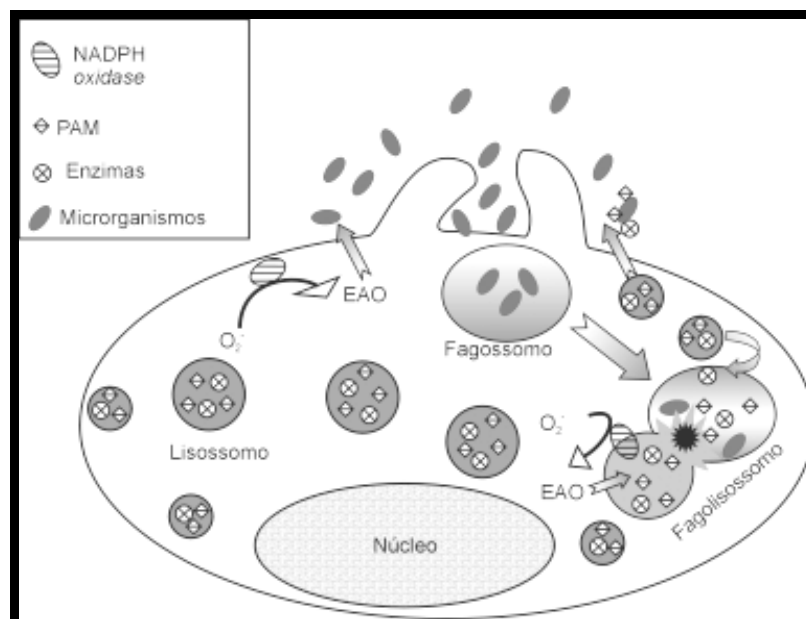


**Figura 3:** Reações celulares de defesa em crustáceos (H - I) H: encapsulamento *in vitro* do nematóide *Panagrellus redivivus* por hemócitos de *M. rosenbergii*; I: encapsulamento *in vitro* de hifas do fungo *Ganoderma* sp por hemócitos de *F. paulensis*, com forte reação de melanização.

Fonte: BARRACCO, 2004.

### 1.3.1.3 Produção de espécies ativas de oxigênio (EAO)

A produção de espécies reativas de oxigênio ocorre, tanto em vertebrados como nos invertebrados, durante o processo de fagocitose de microorganismos. Após a interação do microorganismo com os hemócitos, é ativado um complexo enzimático denominado NADPH-oxidase, que está associado às membranas celulares e catalisa a produção de ânion superóxido ( $O_2^-$ ) no vacúolo fagocítico. Sob a ação da superóxido dismutase o  $O_2^-$  é convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Reações subsequentes podem ainda gerar outras EAO, tais como o radical hidroxila (OH) e o oxigênio “singlet” ( $^1O_2$ ) que também apresentam efeitos citotóxicos e microbicidas (HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; MAGGIONI, 2004; BARRACCO, 2004; LIU *et al.*, 2006) (Figura 4).



**Figura 4:** Mecanismos microbicidas utilizados pelos hemócitos de crustáceos durante o processo de fagocitose de microorganismos.  
Fonte: BARRACCO (2004).

A produção de ânion superóxido é conhecida como explosão respiratória, funciona como indicador indireto do sistema imune, pois é o primeiro EAO a ser liberado pelos hemócitos para destruir microorganismos invasores (MERCIER *et al.*, 2006).

Os radicais  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH$  e  $^1O_2$  são extremamente tóxicos para microrganismos por serem instáveis e capazes de reagir e alterar macromoléculas estruturais como o DNA, proteínas e lipídios (SIQUEIRA; DANTAS, 2000; MERCIER *et al.*, 2006).

### **1.3.2 RESPOSTA IMUNE HUMORAL**

Os fatores humorais compreendem moléculas envolvidas no reconhecimento, aglutinação, melanização e coagulação, que agem na defesa imune sem o envolvimento direto de células, apesar de que, muitos desses fatores serem produzidos e armazenados nos hemócitos (HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; BACHÈRE, 2000). Entre as proteínas de reconhecimento estão as lectinas, os peptídeos antimicrobianos (PAM), as proteínas de ligação de  $\beta$ -1-3-glucana ( $\beta$ GBP) e de lipopolissacarídeo (LPSBP).

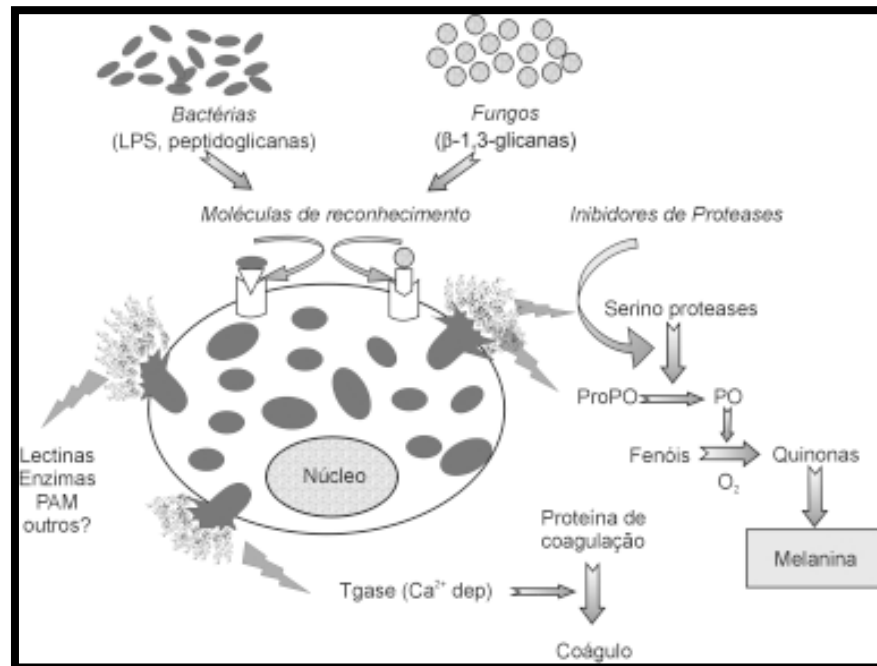
#### **1.3.2.1 Moléculas de reconhecimento**

Na presença de compostos microbianos as proteínas de reconhecimento presentes no plasma têm a função de ampliar a resposta imune celular (Figura 5) (MARQUES; BARRACCO, 2000; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

A proteína de ligação de  $\beta$ -1-3-glucana ( $\beta$ GBP) reconhece a  $\beta$ -glucanas, presentes na parede celular de leveduras, induzindo a degranulação dos hemócitos e a ativação do sistema proPO (VARGAS-ALBORES; YELPIZ-PLASCENCIA, 2000; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

A proteína de ligação de lipopolissacarídeo (LPSBP) reconhece lipopolissacarídeos (LPS) presentes na parede celular de bactérias gram-negativas. Esta proteína funciona como uma aglutinina, pois se une aos hemócitos e estimula a fagocitose (RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).





**Figura 5:** Liberação para o plasma de diferentes efetores imunológicos (lectinas, enzima profenoloxidase, serino protease, peptídeos antimicrobianos, enzima transglutaminase) pelos grânulos dos hemócitos de crustáceos, após sua ativação por componentes da superfície de microrganismos.

Fonte: BARRACCO (2004).

### 1.3.2.2 Lectinas

Um dos mecanismos de defesa da imunidade humoral é mediada pelas moléculas lectinas e/ou aglutininas. Estas são proteínas ou glicoproteínas, dissolvidas no plasma, que se ligam a carboidratos específicos expressos na superfície de diferentes células, promovendo sua aglutinação. Além disso, podem atuar como opsoninas facilitando a fagocitose, promover adesão celular e formação de nódulos (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; MARQUES; BARRACCO, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; COMINETTI *et al.*, 2002).

Devido a sua propriedade de reconhecer o não próprio, aglutinar células e da possibilidade de atuar como opsonina, as lectinas foram inicialmente consideradas análogas funcionais dos anticorpos. No entanto, sabe-se que as lectinas são estruturais e funcionalmente diferentes das imunoglobulinas (MARQUES; BARRACCO, 2000).

A maioria das lectinas dos crustáceos são cálcio dependentes (tipo C). Elas compartilham uma especificidade comum para aminoácidos N-acetilados, especialmente os derivados do ácido siálico e sialconjugados. Resíduos de ácido siálico são comumente encontrados na membrana celular de quase todos os animais deuterostomados e são ausentes em protostomados incluindo os crustáceos. Por isso, a presença de lectinas-ácido siálico na

cavidade corporal de crustáceos pode indicar que estas moléculas possuem um papel de defesa contra patógenos com ácido siálico exógenos (MARQUES; BARRACCO, 2000; COMINETTI *et al.*, 2002; MAGGIONI, 2004).

### 1.3.2.3 Sistema profenoloxidase (proPO) e formação de melanina

Os mecanismos de defesa em muitos invertebrados são freqüentemente acompanhados pelo processo de melanização. Em artrópodes, a síntese de melanina está envolvida no processo de cicatrização de feridas da cutícula e nos mecanismos de defesa celular tais como: fagocitose, formação de nódulos e cápsulas que atuam combatendo os patógenos presentes na hemocele (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; BACHÈRE, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

A enzima envolvida na formação da melanina é a fenoloxidase (PO), que está presente na hemolinfa, sob a forma de uma pró-enzima inativa, a profenoloxidase (proPO) (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; CHENG; CHEN, 2000). A ativação da PO é mediada por uma serino protease, denominada enzima ativadora de profenoloxidase (ppA) (SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000; VARGAS-ALBORES; YELPIZ-PLASCENCIA, 2000; LIU *et al.*, 2006). Em crustáceos, tanto o proPO como a ppA inativa estão estocadas em grânulos secretórios dos hemócitos granulares e semi-granulares, de onde eles são secretados por exocitose (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

O sistema de ativação da profenoloxidase inicia-se a partir do reconhecimento de padrões moleculares nos microorganismos, tais como  $\beta$ -1-3-glucana de fungos, peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas e de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas. A enzima PO ativa catalisa a oxidação de compostos fenólicos e quinonas que se polimerizam formando depósitos insolúveis de melanina, processo este chamado de melanização. A melanina sempre se deposita em torno de microorganismos encapsulados, em nódulos de hemócitos e em sítios de infecção fúngica na cutícula (RATCLIFFE, 1985; JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; SRITUNYALUCKSANA *et al.*, 1999; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; VARGAS-ALBORES; YELPIZ-PLASCENCIA, 2000; CHENG; CHEN, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; THEOPOLD *et al.*, 2004; LUCIEN-BRUN, 2006).

A ativação da proPO deve ser altamente controlada, para evitar a melanização em locais que não estejam infectados. O papel da melanina nas respostas imunológicas dos

artropodes, ainda não está claramente elucidado. No entanto, sabe-se que a síntese deste componente e de seus compostos intermediários gera moléculas tóxicas, como as quinonas, e vários radicais livres das EAO, que são altamente reativos e podem funcionar como potentes destruidores de patógenos (JOHANSSON; SÖDERHÄLL, 1989; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; MAGGIONI, 2004).

O sistema proPO pode ser ativado na ausência de polissacarídeos microbianos, isso ocorre se a concentração do íon cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) diminuir na hemocele. Essa rota de ativação do sistema proPO provavelmente ocorre durante as respostas aos ferimentos e na coagulação (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992). Outro fato interessante do sistema proPO está na sua similaridade com a via alternativa do sistema complemento dos mamíferos. Ambos os sistemas são ativados em cascata, sendo acionados por endotoxinas e  $\beta$ -1,3-glucana (RATCLIFFE, 1985; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

#### 1.3.2.4 Peptídeos antimicrobianos (PAM)

Um dos componentes de defesa, encontrados na hemolinfa dos crustáceos, que vem despertando interesse são os peptídeos antimicrobianos (PAM) (STEINER *et al.*, 1981; HOFFMANN *et al.*, 1999; BACHERE; DESTOUMIEUX; BULET, 2000).

Os PAM podem apresentar uma atividade microbicida rápida e potente contra bactérias gram-positivas, fungos, leveduras e, em alguns casos, até contra vírus envelopados e protozoários. São moléculas catiônicas de baixo peso molecular que funcionam como antibióticos naturais, promovendo a inibição do crescimento, ou o aumento da permeabilidade da membrana celular dos microrganismos levando a lise (STEINER *et al.*, 1981; BULET *et al.*, 1999; HOFFMANN *et al.*, 1999, RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004).

Em *L. vannamei*, três peptídeos antimicrobianos, denominadas peneidinas, foram purificados dos hemócitos e do plasma. As peneidinas são produzidas e liberadas pelos hemócitos semi-granulares e possuem ainda a capacidade de se ligar à quitina, o que sugere que possam conferir proteção aos camarões durante o processo de muda. Infelizmente, estes PAM não mostraram atividade contra bactérias gram-negativas, incluindo do gênero *Vibrio*, que são as bactérias mais prejudiciais aos cultivos de camarões na atualidade (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; BACHÈRE, 2000; WICKINS; O'CLEE, 2002; MOTESDEOCA *et al.*, 2002; BARRACCO, 2004; MAGGIONI, 2004).

### 1.3.2.5 Sistema de coagulação e cicatrização de feridas

Para os crustáceos que apresentam uma circulação aberta, uma coagulação rápida e eficiente constitui-se um mecanismo de defesa essencial, pois garante a vedação dos ferimentos, prevenindo a perda de hemolinfa e impedindo a entrada de microorganismos (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; VAN DE BRAAK; FABER; BOON, 1996; WICKINS; O'C LEE, 2002; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

Em crustáceos, o sistema de coagulação ocorre através da polimerização de proteínas de coagulação presentes na hemolinfa e pela ação de enzimas transglutaminase (TGase) dependente de cálcio. Essa cascata é induzida quando a TGase é secretada dos hemócitos ou tecidos, tornando-se ativa pelo  $\text{Ca}^{+2}$  presente na hemolinfa, dando início a formação de agregados entre resíduos de lisina e glutamina expostos na proteína de coagulação (PC), formando o coágulo (RATCLIFFE, 1985; MUTA; IWANAGA, 1996; HOLMBLAD; SÖDERHÄLL, 1999; BACHÈRE, 2000; LEE; SÖDERHÄLL, 2002; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003; BARRACCO, 2004; THEOPOLD *et al.*, 2004).

Situações de estresse e infecções, geralmente causam um desequilíbrio no processo de coagulação da hemolinfa resultando numa coagulação mais lenta e deficiente (MAGGIONI, 2004; SANTOS *et al.*, 2005).

## 1.4 TÉCNICAS INDICADORAS DO ESTADO DE SAÚDE DO CAMARÃO

Todas as técnicas que vem sendo empregadas no diagnóstico e controle das enfermidades no cultivo de camarão foram adaptadas das tradicionais técnicas conduzidas na Histopatologia, Virologia, Bacteriologia e Parasitologia (ANDRADE; LIGHTNER; ROCHA, 2006). O diagnóstico de doenças em organismos aquáticos é constituído de um conjunto de observações de campo e testes de laboratório, tais como: exame à fresco, quadro clínico, histopatologia, microscopia eletrônica, identificação microbiológica, métodos sorológicos e moleculares (LIGHTNER; REDMAN, 1998; NUNES; MARTINS, 2002). Dentre as técnicas hemato-imunológicas utilizadas para determinar o estado de saúde de camarões temos: a contagem total (THC) e diferencial (DHC) de hemócitos, atividade da fenoloxidase, atividade fagocítica, eficiência do clearance, atividade antibacteriana e a liberação de espécies ativas de oxigênio (EAO). A contagem total de hemócitos, realizada em hemocitômetro ou câmara de Neubauer é um dos parâmetros mais utilizados para avaliar o estado de saúde de crustáceos

(LIGHTNER; REDMAN, 1998; RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002; MAGGIONI, 2004; BARRACCO, 2004).

Na maioria das espécies de crustáceos, a variação na contagem total e diferencial de hemócitos é elevada intra e interespecificamente, podendo variar grandemente em resposta a diversas condições físico-químicas e biológicas, como hipóxia, variação de salinidade, densidade populacional, atividade endócrina durante o ciclo de muda e infecções (RODRIGUEZ; LE MOULLAC, 2000; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002; CHENG *et al.*, 2003; BARRACCO, 2004; LIU *et al.*, 2004; WANG; CHEN, 2005; WANG; CHEN, 2006a).

A sustentabilidade da indústria do camarão depende do controle de doenças bem como do estado de saúde desse animal. Nesse sentido, medidas de biossegurança e técnicas adequadas de manejo são de vital importância tanto para a prevenção como para a minimização dos efeitos ocasionados pelas doenças (JORY; DUGGER, 2000; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; ROCHA, 2002; MORE; FRELIER, 2002).

Considerando que o cultivo de *Litopenaeus vannamei* é de grande importância para a economia do Estado do Rio Grande do Norte, e que pouco se conhece acerca dos fatores de defesa do camarão, pesquisas sobre a imunidade do camarão, tornam-se imprescindíveis, na tentativa de estabelecer diagnósticos utilizando técnicas de baixo custo e fácil manuseio (RATCLIFFE, 1985; BACHÈRE, 2000; NUNES; MARTINS 2002; ANDRADE; LIGHTNER; ROCHA, 2006).

A avaliação do estado de saúde do camarão é crucial para atestar a adequação das práticas de manejo, a ausência de patógenos e garantir o sucesso do cultivo. Desta forma, é importante o monitoramento de parâmetros imunes destas espécies que podem funcionar como indicadores da sanidade do camarão de cultivo, bem como, compreender a influência de fatores físico-químicos e biológicos sobre os parâmetros imunes.

## 2. OBJETIVOS DA PESQUISA

### 2.1 Objetivo geral

- Avaliar os parâmetros hemato-imunológicos do camarão *Litopenaeus vannamei* com e sem infecção por IHHNV, cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem no Estado do Rio Grande do Norte.

### 2.2 Objetivos específicos

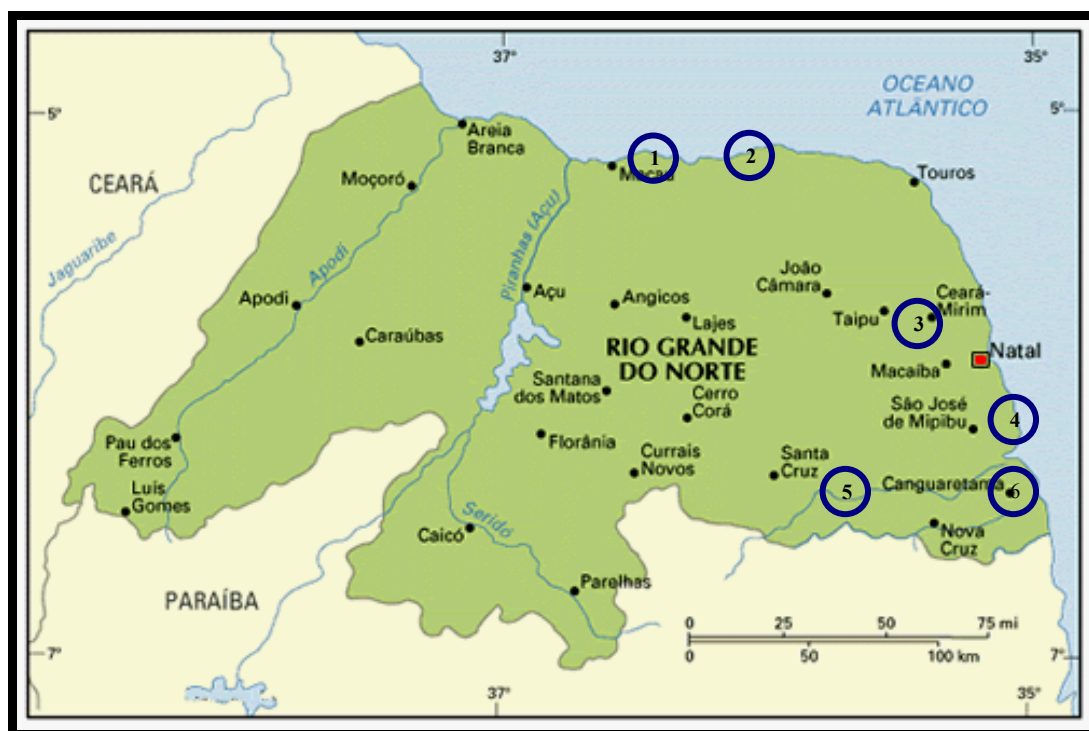
- Determinar o número total de hemócitos (THC) em camarões *L. vannamei* saudáveis e infectados pelo IHHNV, cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem;
- Avaliar a atividade aglutinante (AA) do soro de camarões *L. vannamei* saudáveis e infectados pelo IHHNV cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem;
- Determinar o tempo de coagulação (TC) do soro de camarões *L. vannamei* saudáveis e infectados pelo IHHNV cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem;
- Diagnosticar a infecção pelo IHHNV por PCR em camarões *L. vannamei* cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem;
- Avaliar o efeito da salinidade, densidade de estocagem e da infecção pelo IHHNV sobre os parâmetros imunes THC, atividade aglutinante e tempo de coagulação de camarões *L. vannamei* cultivados em viveiros de diferentes salinidades e densidades de estocagem (Artigo I).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo

Os animais foram coletados em fazendas de camarão, situadas nos municípios de: Guararé, São Bento do Norte, Ceará-Mirim, Nísia Floresta, Tangará e Canguaretama, localizadas próximo do litoral do Estado do Rio Grande do Norte (Figura 6).

As amostras coletadas para o estudo eram cultivadas em viveiros de águas classificadas pela salinidade como oligohalina (0-0,5 ‰), mesohalina (19-24 ‰) ou hiperhalina (38-50 ‰) de acordo com a Resolução do CONAMA nº 357 (17 de março de 2005 – cap. 1, artigo 2º), e com faixas de densidade de estocagem estabelecidas como extensiva (7-12 camarões.m<sup>-2</sup>), semi-intensiva (15-20 camarões.m<sup>-2</sup>) ou intensiva (24-45 camarões.m<sup>-2</sup>) de acordo com LI et al. (2006).



**Figura 6:** Localização das fazendas de camarão *L. vannamei* nos municípios do Estado do Rio Grande do Norte (1: Guararé; 2: São Bento do Norte; 3: Ceará-Mirim; 4: Nísia Floresta; 5: Tangará; 6: Canguaretama).

Fonte: Modificado de CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE ESTADO DA ADMINISTRAÇÃO, 2007.

### 3.2 Coleta de animais

Foram utilizados 450 camarões da espécie *L. vannamei* em estágio de intermuda, escolhidos aleatoriamente, pesando em média  $10,68 \pm 2,70$  g. Os animais foram fornecidos por sete fazendas de camarão localizadas próximo do litoral do Estado do Rio Grande do Norte. As amostras foram coletadas nas próprias fazendas, com o objetivo de diminuir o estresse no animal. As coletas foram realizadas no período de agosto de 2004 a março de 2007.

Em paralelo foram obtidas informações sobre os parâmetros dos viveiros, como salinidade e densidade de estocagem.

### 3.3 Descrição e taxonomia da espécie em estudo

De acordo com recente revisão taxonômica realizada por Pérez-Farfante e Kensley (1997) o camarão *Litopenaeus vannamei* pode ser classificado da seguinte forma:

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea Pennant, 1777

Classe Malacostraca Latreille, 1806

Subclasse Eumalacostraca Grobben, 1892

Superordem Eucarida Calman, 1904

Superfamília Penaeoidea Rafinesque, 1815

Família Penaeidae Rafinesque, 1815

Subfamília Penaeinae Dana, 1852

Gênero *Penaeus* Fabricius, 1798

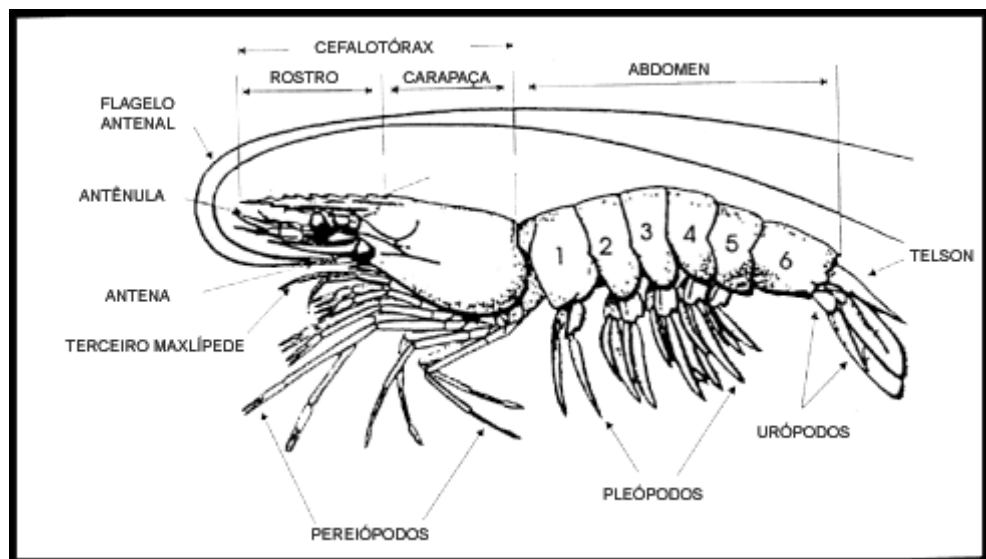
*Litopenaeus* Pérez-Farfante e Kensley, 1997

Espécie *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931.

*L. vannamei* possui o corpo alongado, coberto por um exoesqueleto calcificado de quitina segmentado, dividido em duas regiões: o cefalotórax (cabeça e tórax fundidos) e o abdômen. No cefalotórax estão presentes os principais órgãos funcionais (brânquias, estômago, coração e hepatopâncreas), os olhos pedunculados, um par de antenas e antênulas e o rostró (estrutura de defesa do animal). Na porção ventral do cefalotórax são encontradas as



estruturas de detecção, captura e manipulação do alimento (maxilípedes e pereiópodos). O abdômen é subdividido em segmentos, estende-se desde a parte final do cefalotórax até o telson, e no abdômen que se concentra a maior parte da musculatura do camarão. É na região ventral do abdômen que estão localizadas estruturas natatórias (os pleópodos e os urópodos), o apêndice reprodutivo dos machos e parte do cordão nervoso (BROCK; MAIN, 1994; NUNES; MARTINS, 2002) (Figura 7).



**Figura 7:** Anatomia externa de um camarão peneídeo.  
Fonte: Modificado de Brock e Main (1994).

### 3.4 Extração de DNA e PCR para detectar a presença de IHHNV em camarões

#### 3.4.1 Coleta de pleópodos e extração de DNA

Um pleópodo de cada camarão foi coletado com o auxílio de pinça, previamente esterilizada, e fixado em etanol 95%. O material colhido foi mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do DNA. Inicialmente, o etanol 95% foi descartado e o pleópodo foi lavado previamente com TE 1x [Tris 10mM, EDTA 1mM (Invitrogen), pH 8,0] por duas vezes, em seguida foi adicionado 500  $\mu\text{l}$  tampão de lise [TE 1x, contendo SDS 1% (Invitrogen) e 10  $\mu\text{l}$  proteinase K (Invitrogen). O tecido foi previamente macerado com uma pequena haste de madeira estéril, e incubado a  $65^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Posteriormente foram adicionados 72  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M (Sigma) e 52  $\mu\text{l}$  de CTAB 10% (Brometo de hexatrimetilamino - Sigma) e

incubado a 55°C por 1 hora. Para proceder a separação de DNA das proteínas, foi adicionado clorofórmio:álcool isoamílico (Synth) na proporção de 24:1 e misturados por inversão várias vezes, seguido por uma centrifugação por 5 minutos a 20.000 g, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado, repetindo-se o passo com clorofórmio:álcool isoamílico. A seguir, ao sobrenadante foram adicionados 600 µl de isopropanol (Merck) e centrifugado a 10.000 g durante 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuscitado com 250 µl de etanol 70% (Merck) gelado e centrifugado a 1.300 g durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente foi descartado todo o etanol e o procedimento de lavagem foi repetido. Terminada esta etapa, deixou-se o tubo em temperatura ambiente para evaporar todo o etanol. O DNA foi então ressuscitado em 100 µl de água ultrapura autoclavada e as amostras de DNA foram mantidas a -20°C até o momento da sua utilização (modificado de SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.4.2 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e Eletroforese

Alíquotas das amostras de DNA extraído de cada pleópodo foram submetidas à amplificação, pela Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), para detecção de uma sequência específica do IHHNV (acesso n°. AF218266, GenBank). Simultaneamente, um fragmento do gene da  $\beta$ -actina de *L. vannamei* foi amplificado como controle da eficiência do processo de extração.

A reação foi realizada em uma mistura de volume final de 25 µl, contendo água ultra pura estéril, 0,5 µM de oligonucleotídeos específicos [5'-AACAGCCAGTACGACATCAACC-3' (sense) e 5'-CGGCGTGTTCCTTCGTCCTTCATT-3' (antisense)] para uma região codificadora de proteína não estrutural e do capsídeo viral, dNTPs 0,2 µM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, Taq-DNA polimerase 0,5 U (Invitrogen, São Paulo - Brasil), tampão 10X (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) e 2,5 µl de DNA. Foram utilizados como controle negativo e positivo, respectivamente, água ultrapura estéril e DNA extraído de camarão positivo para IHHNV, gentilmente cedido pelo CEDOC (Centro de Diagnóstico de Doenças do Camarão).

A reação foi realizada em termociclador (Mastercycler Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) nas seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C/5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95°C/1 minuto, anelamento a 62°C/1 minuto e extensão a 72°C/1 minuto e 1 ciclo de extensão final a 72°C/7 minutos.

Uma segunda PCR foi realizada como controle do processo de extração, para as amostras que não amplificaram o fragmento do vírus, com as mesmas condições descritas acima, porém utilizando os oligonucleotídeos específicos para o gene da  $\beta$ -actina de camarão. As amostras de DNA foram utilizadas não-diluídas até a diluição 1/100, para obter uma concentração de DNA que permitisse detectar o fragmento de  $\beta$ -actina.

Posteriormente o produto da PCR foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% em tampão TBE 1X (Tris base 0,08 M; Ácido bórico 0,08 M; EDTA 0,002 M; pH 8,4) e revelado pela prata, conforme Sanguinetti *et al.* (1994).

Para a corrida eletroforética foram misturados 3  $\mu$ l do tampão de corrida e 3  $\mu$ l do produto da PCR, aplicados no gel, mergulhado no tampão TBE 1X. A corrida eletroforética, foi feita a 90 V, 40 mA, por aproximadamente 1 hora. O gel foi colocado em uma solução fixadora (etanol 10%, ácido acético 0,8%) e agitado durante 5 minutos em agitador magnético. Em seguida foi adicionada uma solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$  3%) e repetida a agitação por 15 minutos. Após esse procedimento o gel foi lavado duas vezes com água destilada, acrescentando-se posteriormente a solução reveladora (4,5 g de NaOH; 500  $\mu$ l de formol em 150 ml de água destilada) e novamente agitado por 15 minutos, até a visualização dos fragmentos de DNA. O tamanho do fragmento foi determinado em comparação a um padrão de DNA de 100 pb (Invitrogen, California, EUA).

### **3.5 Coleta de hemolinfa e análise de parâmetros hemato-imunológicos**

#### **3.5.1 Contagem total de hemócitos (THC)**

A hemolinfa de cada camarão foi coletada, para determinação do número de hemócitos, utilizando-se uma seringa de 3 ml, acoplada a uma agulha de 0,7X25 mm (22 G), contendo 400  $\mu$ l de uma solução anticoagulante MAS (solução Alsever modificada: 27 mM citrato de sódio, 336 mM cloreto de sódio, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, formaldeído 4%, pH 7,0). Para a coleta de 100  $\mu$ l de hemolinfa, a agulha foi inserida na região ventral do primeiro segmento abdominal, após assepsia com álcool a 70%. As amostras foram mantidas a 4°C até o momento da contagem (MAGGIONI, 2004).

Para a determinação da THC, a hemolinfa foi diluída individualmente a 1:20 com solução anticoagulante MAS, colocada numa câmara de Neubauer, e posteriormente, foi realizada a contagem de células por  $\text{mm}^3$  de hemolinfa em um microscópio óptico, utilizando

objetiva de aumento 40x, semelhante à contagem realizada para glóbulos brancos (CARVALHO, 1994; DACIE; LEWIS, 1995).

O cálculo do número de hemócitos contados foi determinado pela fórmula:

$$\text{THC} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de hemócitos} \times \text{fator de diluição} \times 10^4}{4} = \text{n}^{\circ} \text{ de hemócitos} / \text{mm}^3 \text{ hemolinfa}$$

### 3.5.2 Determinação da atividade aglutinante (AA)

A hemolinfa de cada camarão foi coletada, após assepsia com álcool a 70%, utilizando-se seringa de 3 ml, acoplada a uma agulha de 0,7X25 mm (22 G), cuja agulha foi inserida na região ventral do primeiro segmento abdominal. Após a coleta, a hemolinfa foi deixada coagular por 24 horas a 4°C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos a 20°C, repetidas vezes, até se obter a separação entre o coágulo e o soro. O coágulo foi desprezado e o sobrenadante que corresponde ao soro foi coletado e armazenado a -20°C para posterior análise da atividade aglutinante (MAGGIONI, 2004).

Amostras de sangue humano (Grupo A) foram obtidas por punção venosa, sendo coletadas com solução anticoagulante (doadas pelo Hemonorte). Antes do ensaio da atividade aglutinante, as hemácias foram lavadas com solução salina 0,15 M e centrifugadas repetidamente a 500 g, por 3 minutos a temperatura ambiente. Após a lavagem, foi feita a determinação da concentração do sangue através do hematócrito.

Para determinar a atividade aglutinante, as amostras de 50 µl de soro de cada camarão foram adicionadas em poços de uma placa de microtitulação (fundo em “U”) e submetidas a diluições seriadas, utilizando-se TBS-2 (50 mM TRIS, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,4) como diluente. O mesmo volume de uma suspensão de eritrócitos frescos a 2% em TBS-1 (50 mM TRIS, 400 mM NaCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,6) foi adicionado em cada poço e as placas foram incubadas por 2 a 3 horas a temperatura ambiente para obtenção do título aglutinante. Nos controles negativos, o soro dos camarões foi substituído por TBS-2. O título da atividade aglutinante natural do soro dos camarões foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação.

### 3.5.3 Determinação do tempo de coagulação (TC)

A hemolinfa de cada camarão foi coletada utilizando-se um bisturi estéril cuja lâmina foi inserida na região dorsal entre o cefalotórax e o abdômen, após assepsia com álcool a 70%. A hemolinfa foi colocada diretamente sobre uma lâmina de vidro até que ocorresse a coagulação. O tempo de coagulação (em segundos) foi então anotado (figura 8).



**Figura 8:** Coleta de hemolinfa e avaliação do tempo de coagulação.  
Fonte: Adaptação SANTOS, 2005.

### 3.6 Análise estatística dos dados

Os valores da contagem total de hemócitos (THC), atividade aglutinante (AA) e tempo de coagulação (TC) foram expressos através da média  $\pm$  desvio padrão.

Para a análise de significância da taxa de infecção do IHHNV nas diferentes salinidades e densidades de estocagem foi utilizado o teste qui-quadrado.

O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi usado para testar a significância da influência da salinidade, densidade de estocagem e a infecção pelo IHHNV nos parâmetros imunes THC, AA e TC, realizado pelo software Bioestat 4.0 ( $P < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

### **ARTIGO I**

**Effect of salinity, stocking density and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on the immune parameters of pond-cultured *Litopenaeus vannamei***

Artigo submetido à  
Revista Aquaculture Research  
ISSN: 1355-557X  
Revista Internacional  
Fator de impacto 1.051

**Effect of salinity, stocking density and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) on the immune parameters of pond-cultured *Litopenaeus vannamei***

Lígia Garcia Reis<sup>1</sup>, Cimária Porfírio Rodrigues de Oliveira da Silva<sup>1</sup>, Fabiana Lima Bezerra<sup>1</sup>, José Veríssimo Fernandes<sup>1</sup>, Francisco Emmanoel Napoleão Varela Barca, Mauricio Pereira de Sales<sup>2</sup>, Regina de Fátima dos Santos Braz<sup>1\*</sup>

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências,

<sup>1</sup>Departamento de Microbiologia e Parasitologia, <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Campus

Universitário Lagoa Nova,

CEP 59072- 970, Natal- RN, Brazil.

\* Corresponding author. Tel/fax: 55 84 32119210.

E-mail: [braz@ufrnet.br](mailto:braz@ufrnet.br) (R. F. S. Braz)

### Abstract

Environmental changes involving oxygen concentration, salinity, temperature, stocking density, pathogen presence, among others, trigger a stressing condition in cultured shrimp which weakens them and leads to disease outbreaks. In this study, we investigated the effects of salinity, stocking density and IHHNV infection on the immunological parameters of total hemocyte counts (THC), agglutinating activity (AA) and clotting time (CT) of pond-cultured *Litopenaeus vannamei* on low (0-0.5 ‰), medium (19-24 ‰) and high (38-50 ‰) salinity farms and cultured at extensive (7-12), semi-intensive (15-25) and intensive (33-45 shrimp.m<sup>-2</sup>) stocking densities. The IHHNV infection rate was significantly higher in low salinity and at intensive stocking density. Low salinity significantly increased THC and decreased CT in healthy and infected shrimp, but AA was significantly lower in healthy shrimp cultured in medium salinity. Culture intensification did not affect the THC, AA and CT of healthy and infected shrimp ( $P>0.05$ ). IHHNV infection did not affect any immune parameters of shrimp cultured at different salinities and stocking densities. Immune pattern variations among salinity and stocking density levels might be explained by the various environmental factors acting simultaneously in the ponds.

*Keywords:* *Litopenaeus vannamei*; Hematological parameters; Salinity; Stocking density; IHHNV infection; Ponds



## 1. Introduction

The infectious diseases of viral etiology represented a major economic barrier for the shrimp aquaculture industry. Among the viruses, the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) is one of the major causes of disease in cultured penaeid shrimp. The IHHNV, a member of the family Parvoviridae, is a small (22 nm in diameter), icosahedral, non-enveloped virus containing single-stranded linear DNA (ssDNA), with a genome of 4.1 Kb (Bonami *et al.* 1990; Tang & Lightner 2001).

Diseases in shrimp farming are a result of a complex interaction among shrimp, their environment, and the pathogen itself (Lightner & Redman 1998; Kautsky *et al.* 2000; Mercier *et al.* 2006). Reared shrimp are exposed to changes in the physical-chemical and biological conditions in ponds, such as pH, temperature, dissolved oxygen, salinity, toxic substances, stocking density, inadequate management practices and pathogens (Le Moullac & Haffner 2000; Perazzolo *et al.* 2002; Chim *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2003). These factors can cause stress in the animal, leading to quantitative and qualitative changes in the immune system, as well as decreased growth and lower survival rates (Tseng & Chen 2004; Wang & Chen 2005; Jiang *et al.* 2005).

*Litopenaeus vannamei* is the main marine species cultured on Latin America shrimp farms (Brock & Main 1994; FAO 2006). It is known to tolerate wide variations in salinity (0-60 ‰), showing a better performance in salinities above 20 ‰ and temperatures between 25-35°C (Ponce-Palafox *et al.* 1997). Although *L. vannamei* is euryhaline, abrupt changes in salinity can cause stress, and when combined with inadequate management practices, may affect metabolism, growth, moult, the immune system and survival (Villarreal *et al.* 2003; Romano & Zeng 2006). The use of intensive cultivation has been widely used in the shrimp

industry, which linked to the quality of water, increases the risk of infection and promotes the transmission of pathogens (Kautsky *et al.* 2000; Johnston *et al.* 2006; Arnold *et al.* 2006).

Crustaceans have an innate immune system, which although nonspecific, is effective in recognizing and destroying pathogens (Ratcliffe 1985; Lee & Söderhäll 2002). This system involves cellular and humoral reactions that are mainly related to their blood or hemolymph (Lee & Söderhäll 2002).

Crustaceans have three types of hemocytes that play different roles in immunity: hyalines, small granular and large granular (Johansson *et al.* 2000; Rendón & Balcázar 2003; Zhang *et al.* 2006). They play a central role in immune response (Bachère 2000), performing functions such as coagulation, phagocytosis, encapsulation and release of toxic and microbicide molecules (ROIs) (Johansson & Söderhäll 1989; van de Braak *et al.* 1996; Muñoz *et al.* 2000).

The humoral immune response consists of several soluble molecules, such as lectins (Marques & Barracco 2000), components of the prophenoloxidase system (proPO) (Johansson *et al.* 1989; Söderhäll & Cerenius 1992), antimicrobial peptides (Bachère 2000; Holmblad & Söderhäll 1999; Rodriguez & Le Moullac 2000) and proteins involved in hemolymph coagulation (Perazzolo *et al.* 2002; Sritunyalucksana & Söderhäll 2000). Lectins promote opsonization, cell adhesion and node formation (Söderhäll *et al.* 1992; Cominetti *et al.* 2002). The activation of the proPO system culminates in the formation of melanin, which is involved in a variety of immune reactions (Lee *et al.* 2002; Rodriguez *et al.* 2000; Sritunyalucksana *et al.* 1999). The antimicrobial peptides act as natural antibiotics, promoting the inhibition of microbe growth and an increase in the cell membrane permeability of several microorganisms, leading to lysis (Hoffmann *et al.* 1999; Bachère *et al.* 2000; Motesdeoca *et al.* 2002). The quick and efficient coagulation is considered an important defense system in crustaceans for sealing wounds, preventing hemolymph loss and entrapping microorganisms

(Bachère *et al.* 1995; Muta & Iwanaga 1996; Theopold *et al.* 2004). Situations of stress and infections usually cause an imbalance in the hemolymph clotting mechanism, making it slow and inadequate (Maggioni *et al.* 2004).

During shrimp cultivation, different environmental variations, infections and handling procedures may result in stress. The immune responses in shrimp species, to different stressors, have been studied mainly after hours or a few days of exposure; however little is known about the effects of long-term conditions on pond-cultured shrimp.

This study examined the effects of salinity, stocking density and IHHNV infection on a number of hemato-immunological parameters of pond-cultured *L. vannamei*. The immunological parameters investigated were: total hemocyte count (THC), agglutinating activity (AA) and clotting time (CT).

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Shrimp samples**

*L. vannamei* shrimp (n=450) in the intermolt stage were obtained from seven commercial farms located on the coast of Rio Grande do Norte, in northeastern Brazil. De cada viveiro (n=15) foram coletados 30 camarões. The tissue samples were collected on the farms to avoid animal stress. Shrimp were collected from farms located in areas of low (0-0.5 ‰), medium (19-24 ‰) and high (38-50 ‰) salinity and cultured at extensive (7-12 shrimp.m<sup>-2</sup>), semi-intensive (15-25 shrimp.m<sup>-2</sup>) and intensive (33-45 shrimp.m<sup>-2</sup>) stocking densities.

## 2.2. Pleopod collection and DNA extraction

Shrimps were disinfected with 70% ethanol and one pleopod was collected and kept in 95% ethanol until PCR processing. The pleopods, were washed with TE buffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8.0). DNA extraction from pleopods was performed using lysis buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, SDS 1%, pH 8.0) and 10 mg/ml proteinase K. Pleopods were homogenized and incubated at 65° C for 1 h. After that, 5 M NaCl and 10% CTAB were added and incubated at 55° C for 1 h. DNA separation from protein was done by centrifugation in a mix of chloroform: isoamyl alcohol. DNA was precipitated in isopropanol and the pellet was washed in 70% ethanol. Dried DNA was dissolved in water and stored at -20° C (Sambrook *et al.* 1989).

## 2.3. PCR for IHHNV detection

PCR was performed using pleopod homogenate (n=450) as the DNA template. PCR primers were selected from the published IHHNV genomic sequence (GenBank accession no. **AF 218266**). Primers specific to a region that encodes for structural protein, 5'-AACAGCCAGTACGACATCAACC-3' (sense) and 5'-CGGCGTGTTCCTTCGTCTT CATT-3' (antisense), were used. PCR was carried out in a final volume of 25 µl, containing PCR buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.3); 0.2 µM dNTPs; 0.5 µM of each primer; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 2.5 µl of template and 0.5 U Taq DNA polymerase. PCR was performed by denaturation at 95° C for 5 minutes, followed by 40 cycles of denaturation at 95° C for 1 minute, annealing at 62° C for 1 minute and polymerization at 72° C for 1 minute, with a final polymerization at 72° C for 7 minutes. Amplification of *L. vannamei* β-actin gene was performed as a control of the DNA extraction process. Positive control from the IHHNV kit,

(Diagxotics, USA), kindly donated by the Center for Shrimp Diseases (CEDOC-RN-Brazil) and ultra-pure water as negative control were used. For electrophoresis, the PCR products were run on an 8% polyacrylamide gel, stained with silver nitrate (Sanguinetti *et al.* 1994). A 185 bp DNA fragment in the gel indicated the presence of IHHNV in the sample.

#### 2.4. Total hemocyte count (THC)

For hemocyte counts, 100  $\mu$ l of hemolymph was withdrawn from the ventral sinus of each shrimp into a 3 ml sterile syringe (22 G) containing 400  $\mu$ l of anticoagulant solution (modified Alsever solution or MAS: 27 mM sodium citrate, 336 mM sodium chloride, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, 4% formaldehyde, pH 7.0). Total hemocyte counts were performed in a hemocytometer using an optical microscope.

#### 2.5. Hemolymph collection for serum preparation

Shrimp hemolymph was collected by inserting a 22 G needle coupled to a 3 ml syringe into the ventral sinus and left to coagulate for 24 h at 4° C in a microtube. The clot was repeatedly centrifuged at 5000 g for 10 minutes to obtain the serum, which was stored at -20° C.

#### 2.6. Agglutinating activity (AA)

Samples of 50  $\mu$ l of each shrimp serum were added to a U-shaped 96-well microtiter plate and twofold serial dilution was prepared using TBS-2 (50 mM Tris, 150 mM NaCl<sub>2</sub>, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) as the diluent. The same volume of a 2% suspension of

fresh human A erythrocytes in TBS-1 (50 mM TRIS, 400 mM NaCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.6) was added to each well and incubated for 2-3 h at room temperature in a humid chamber. In negative controls, the serum was replaced by TBS-2. The agglutinating titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution showing a positive agglutination pattern.

### 2.7. Clotting time (CT)

The hemolymph of each shrimp, disinfected with 70% alcohol, was collected using a sterile scalpel, inserted into the shrimp's back, between the cephalothorax and abdomen. A drop of hemolymph was transferred to a slide and the clotting time (in seconds) for the hemolymph drop to gel was recorded.

### 2.8. Statistical analysis

Data on THC, CT and AA were expressed as mean  $\pm$  S.D. The chi-square test was used to determine the significant differences among the IHHNV infection rates at different salinities and stocking densities. A Kruskal-Wallis non-parametric test was applied to test the significance of salinity, stocking density and IHHNV effects on immune parameters THC, AA and CT, using the Bioestat 4.0 software (Ayres *et al.* 2005).

### 3. Results

#### 3.1. Determination of IHHNV infection by PCR

IHHNV infection was detected using PCR to amplify specific DNA extracted from pleopods. A single 185 bp product was amplified from the IHHNV genome (Fig. 1). The PCR fragment was sequenced to confirm that it was specific to IHHNV. The resulting sequence was compared with available sequences, using the BLAST program, GeneBank.

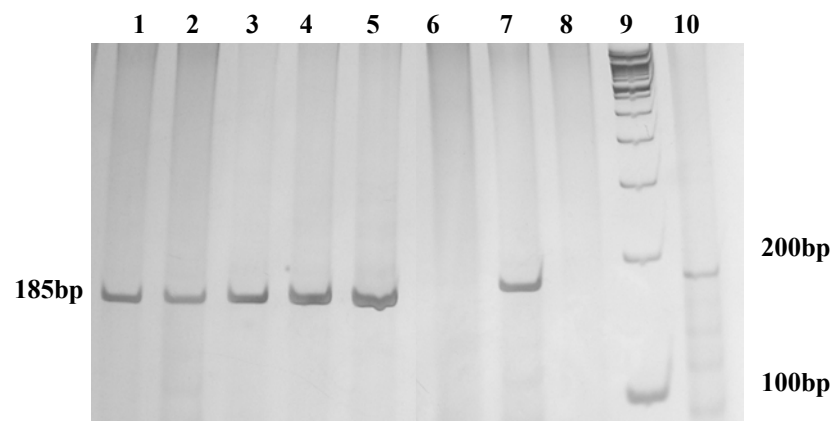


Fig. 1. PCR for detection of IHHNV in *L. vannamei* yield a 185 bp IHHNV-specific fragment. (Lanes 1 to 5 and 10: samples of IHHNV-positive *L. vannamei*, lane 6: sample of IHHNV-negative *L. vannamei*, lane 7: positive control for IHHNV, lane 8: water as negative control, lane 9: 100 bp DNA ladder).

#### 3.2 Effect of salinity and IHHNV infection on the immune parameters of *L. vannamei*

The mean ( $\pm$ SD) THC of healthy shrimp varied from  $100 \pm 89 \times 10^5$  to  $217 \pm 146 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . This parameter of IHHNV-infected shrimp ranged from  $110 \pm 96 \times 10^5$  to  $195 \pm 138 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ . Statistical analysis showed that the THC of healthy and infected shrimp

was significantly higher in low salinity (Fig. 2A), where significantly higher infection rates were also found (Table 1).

The mean ( $\pm$ SD) AA varied from  $27.20 \pm 60.25$  to  $54.74 \pm 75.62$  and  $29.95 \pm 27.03$  to  $71.11 \pm 106.31$  in the healthy and infected shrimp, respectively. The AA of healthy and infected shrimp serum was extremely variable and AA was significantly lower in medium salinity in the healthy shrimp. No significant difference was observed in the infected shrimp held in different salinities (Fig. 2B).

The mean ( $\pm$ SD) CT of healthy and infected shrimp varied from  $7.09 \pm 5.80$  to  $28.94 \pm 23.56$  and from  $8.15 \pm 4.34$  to 65 seconds, respectively. In both groups, the CT of hemolymph was significantly lower in low salinity (Fig. 2C), where the infection rate was higher.

Statistical analysis showed no significant differences in the immune parameter THC, AA and CT between healthy and IHHNV infected-shrimp cultured at the same salinity level.

Table 1  
IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultivated at different salinity levels

Salinity (‰)	Total number of shrimp	IHHNV infection (%)
0 – 0.5	125	48 <sup>a</sup>
19 – 24	40	32.5 <sup>ab</sup>
38 – 50	143	32.9 <sup>b</sup>

Different letters denote significant differences in the infection rate between the salinity levels ( $P < 0.005$ ;  $\chi^2 = 6.37$ ).



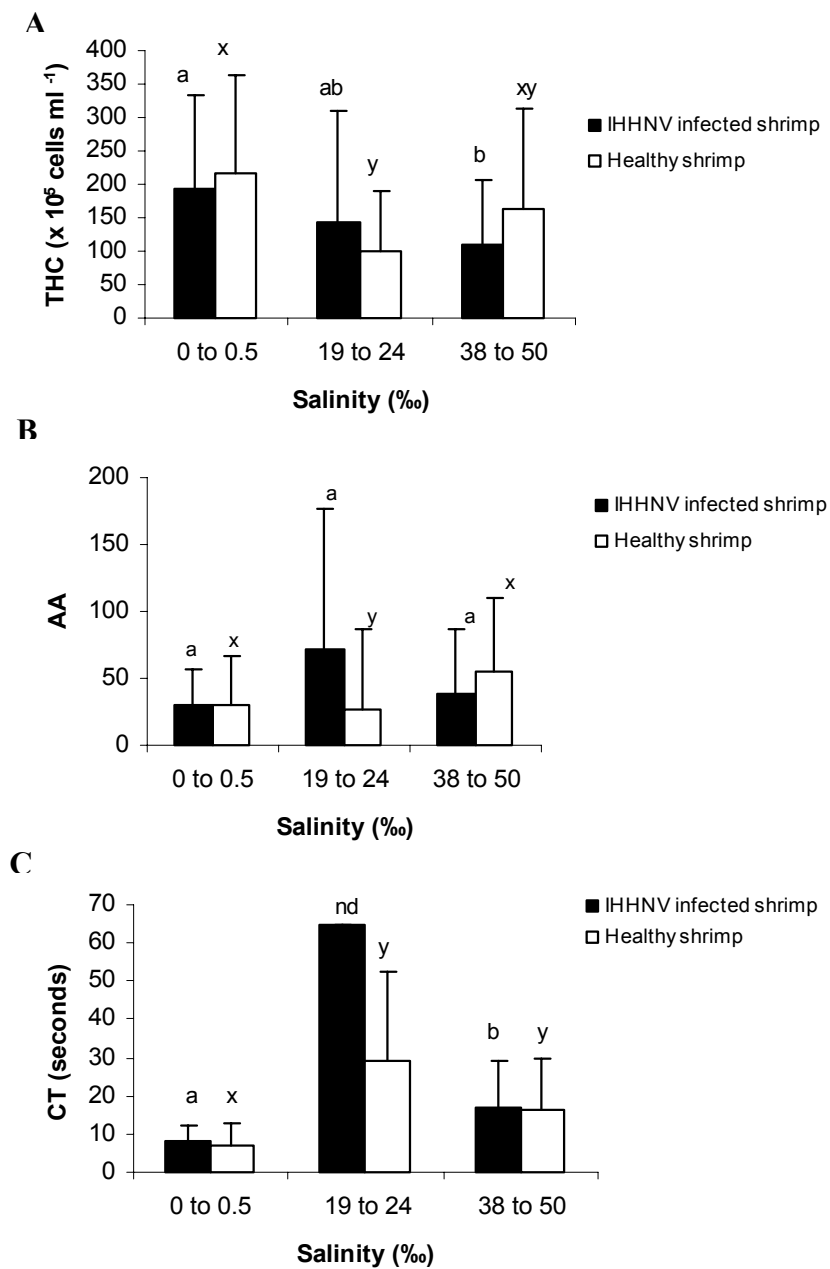


Fig. 2. Total hemocyte count (THC) (A); agglutinating activity (AA) (B) and clotting time (CT) (C) of *L. vannamei* cultivated at three salinity levels. The vertical bars represent the mean value  $\pm$  SD of healthy and IHHNV-infected shrimp immune parameters. The letters indicate a significant difference of the immune parameters between healthy (x, y) and IHHNV-infected (a, b) shrimp cultured at different salinity levels ( $P < 0.05$ ). nd: not determined

### 3.3 Effect of stocking density and IHHNV infection on the immune parameters of *L. vannamei*

The mean ( $\pm$ SD) THC of healthy and infected shrimp varied from  $153 \pm 135$  to  $192 \pm 157 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$  and  $109 \pm 97$  to  $196 \pm 157 \times 10^5$  cells  $\text{ml}^{-1}$ , respectively. The infection rate was significantly higher in intensive stocking density (Table 2), but no significant difference in THC was observed in the healthy and infected shrimp (Fig. 3A).

The mean ( $\pm$ SD) AA in the healthy and infected shrimp varied from  $32 \pm 17.57$  to  $59.41 \pm 89.59$  and  $19.81 \pm 10.50$  to  $42.91 \pm 55.71$ , respectively. Agglutinating activity analysis of the healthy shrimp serum indicated an inverse relation between the number of specimens. $\text{m}^{-2}$  and AA. Statistical analysis showed no significant difference in agglutinating titers of healthy and infected shrimp grown at different stocking densities (Fig. 3B).

The mean ( $\pm$ SD) CT of healthy and infected shrimp ranged from  $10.52 \pm 6.94$  to  $13.96 \pm 12.43$  and  $10.17 \pm 4.29$  to  $17.86 \pm 14.02$  seconds, respectively. No significant difference in CT was observed among healthy and infected shrimp (Fig. 3C).

Statistical analysis showed no significant differences in the immune parameter THC, AA and CT between healthy and IHHNV infected-shrimp cultured at the same stocking density level.

Table 2

IHHNV infection rate in *L. vannamei* cultivated at different stocking density levels

Stocking density (shrimp $\text{m}^{-2}$ )	Total number of shrimp	IHHNV infection (%)
7 – 12	86	37.2 <sup>a</sup>
15 – 25	165	31.5 <sup>a</sup>
33 – 45	57	63.1 <sup>b</sup>

Different letters denote significant differences in the infection rate between stocking density levels ( $P < 0.005$ ,  $\chi^2 = 9.25$ ).

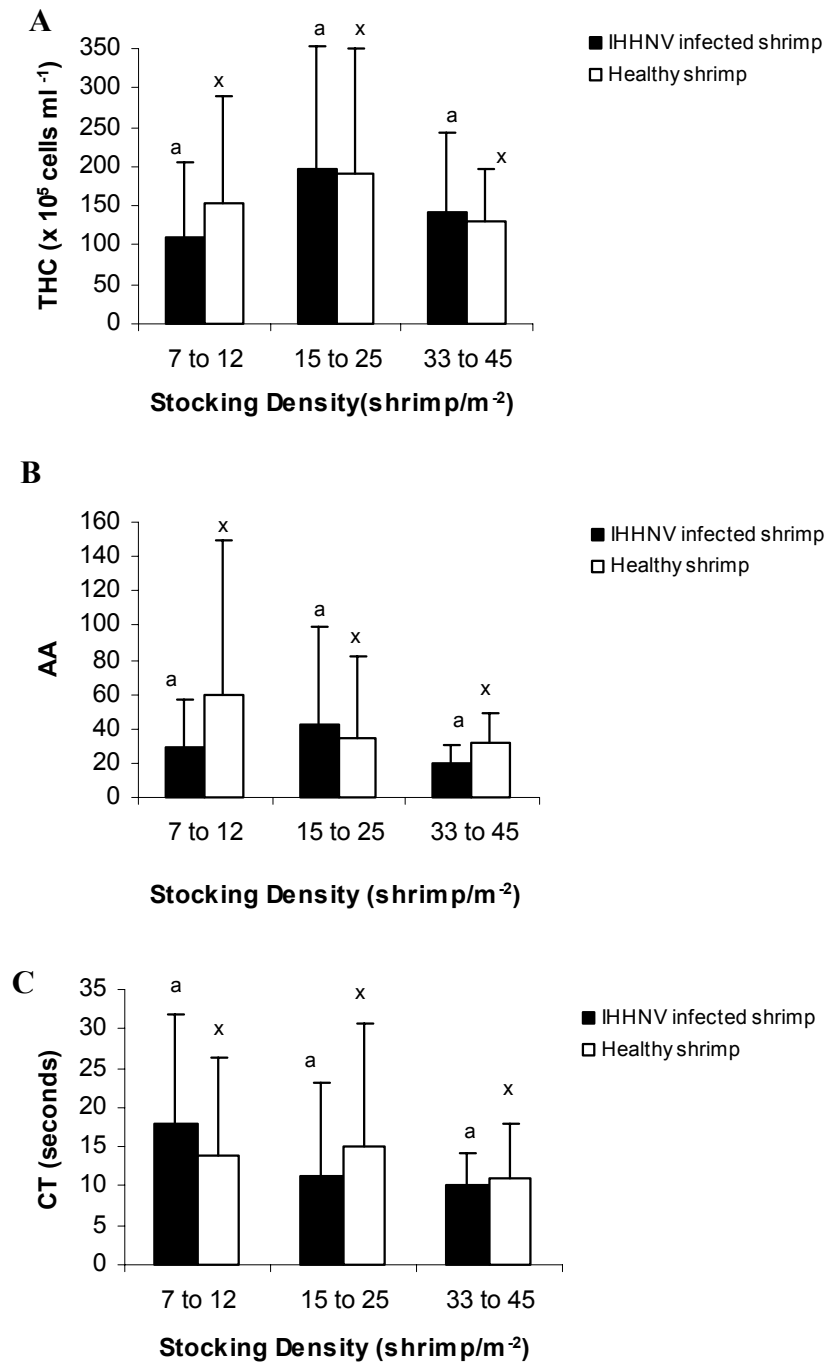


Fig. 3. Total hemocyte count (THC) (A); agglutinating activity (AA) (B) and clotting time (CT) (C) of *L. vannamei* cultivated at extensive (7 -12), semi-intensive (15-25) and intensive (33-45 shrimp. m<sup>-2</sup>) stocking densities. The vertical bars represent the mean  $\pm$  SD of healthy and IHHNV-infected shrimp immune parameters. No significant difference was observed the immune parameters in healthy (x) and infected (a) shrimp cultivated at different stocking densities ( $P > 0.05$ ).

#### 4. Discussion

Farmed shrimp are exposed to different stressors which give rise to a stress response consisting of complicated integrated reactions, including biochemical, physiological and/or behavioural changes (Li *et al.* 2006). Fluctuations in environmental parameters can trigger disease outbreaks not only by affecting the health and defense mechanisms of the host but also by the virulence of the pathogen (Cheng *et al.* 2003; Cheng *et al.* 2004; Liu & Chen 2004).

Kausty *et al.* (2000) reported that at high salinities, *Vibrio harvey* is more lethal to penaeid shrimp than at high temperatures. Cheng *et al.* (2003) reported that *L. vannamei* was more susceptible to *V. alginolyticus* when animals were transferred to 5 ‰ and 15 ‰ from 25 ‰. Moreover, the risk of disease often increases with the culture intensity (Johnston *et al.* 2006; Arnold *et al.* 2006). The disease occurrence in cultured shrimp was correlated with culture intensification and water quality, because they favor the rapid transmission of pathogens (Kausty *et al.* 2000; Johnston *et al.* 2006; Soderhall & Cerenius 1992). IHHNV is one of the most important pathogens that affects the shrimp industry. This virus causes RDS (Runt Deformity Syndrome), which leads to variable growth rates, and reduces the shrimp market value by 10% to 50% (Lightner & Redman 1998). The present study showed that the IHHNV infection rate was significantly higher at low salinity and at intensive stocking density, corroborating with aforementioned authors.

Hemocytes participate in defence reactions by being phagocytic and by playing an important role in wound closure, exoskeleton hardening and clotting in crustaceans (Johansson *et al.* 2000). It has been reported that a low number of circulating hemocyte in crustaceans is strongly correlated with a greater sensitivity to pathogens (Persson *et al.* 1987; Le Moullac *et al.* 1998). THC is one of the most widely used parameters for assessing

crustacean health status, although total numbers of circulating hemocytes are highly variable among crustacean species (Lorenzon *et al.* 1999). Environmental stress can significantly alter shrimp defence, resulting in a reduction of THC and of other immune parameters (Le Moullac & Haffner 2000).

In decapod crustaceans, circulating hemocytes can be affected by extrinsic factors such as temperature, pH, salinity, dissolved oxygen and ammonia (Le Moullac & Haffner 2000; Le Moullac *et al.* 1998) or by intrinsic factors such as life cycle, molting, organ development, reproductive status, nutritional condition and disease (Liu & Chen 2004; Person *et al.* 1987; Cheng & Chen 2001). A significantly higher THC was found in *Farfantepenaeus paulensis* reared in 34 ‰ as compared to those in 22 ‰ and 13 ‰ (Perazzolo *et al.* 2002). The THC of *L. vannamei* decreased when transferred from 25 ‰ to 15 ‰ and 5 ‰ and in these conditions the animals were more susceptible to *V. alginolyticus* (Wang *et al.* 2005). *Macrobrachium rosenbergii* reared in 0 ‰ had a significantly lower THC than those cultured in 15 ‰ and was more susceptible to *Enterococcus* (Cheng & Chen 2000). According to Lorenzon *et al.* (1999) increased hemocyte numbers may provide an enhanced immune capability during periods of higher activity or enhanced environmental bacterial loads when the risk of being wounded is greater. Further research is needed to clarify whether the change in THC results from cell proliferation, cells moving from tissues into circulation, or osmosis of the water between hemolymph and the medium for osmotic regulation (Wang & Chen 2006).

Unlike the THC data observed in laboratory conditions, the THC of healthy and IHHNV-infected shrimp in the present study was higher when cultured in ponds with low salinity, suggesting adaptability of *L. vannamei*, a species highly tolerant to wide limits of salinity, during growth in the pond. The high IHHNV infection rate found at low salinity seems not to have affected THC.

In the present study, high stocking density significantly increased the IHHNV-infection rate. The THC of healthy and infected shrimp seems not to have been affected by different stocking densities. However, the data about THC and stocking density are inconclusive, since the THC value was significantly lower in less stressful extensive density and comparison data in the specialized literature is lacking. Other environmental factors in the nursery may be affecting THC.

Changes in shrimp agglutinating activity under stress conditions have been little investigated and there are few reports on this activity being induced by the presence of microorganisms or foreign particles. An increase in agglutinin concentration was detected in *P. monodon* infected with *V. vulnificus* (Maggioni *et al.* 2004). One of the hemolymph proteins capable of cell agglutination is lectin (Marques & Barracco 2000). A high correlation between protein level and the immunological state of shrimp was suggested and the authors concluded that protein levels could be used as a strong indicator of shrimp health status (Rodríguez *et al.* 2000). Recent studies showed that several hemolymph proteins are involved in the immunological response, including the clotting proteins, serine proteinase, penicidins, and the prophenoloxidase system (Montaño-Perez *et al.* 1999; Destoumieux *et al.* 2000).

Data in the literature about protein concentration are contradictory. A higher protein concentration was observed in *L. vannamei* juveniles exposed to 15 ‰ salinity, compared to shrimp kept at 35 ‰ salinity (Rosas *et al.* 2002). A decrease in total hemolymph proteins was observed in shrimp kept in outdoor tanks under several stressful conditions (Mercier *et al.* 2006). However, Lo *et al.* (1997) reported high concentrations of protein and amino acids in the hemolymph, in a stressful condition of WSSV-infected crustaceans. Low protein levels in shrimp occur because they use proteins in situations of increased energy demands such as stress or in situations of low energy availability, which occurs during starvation, suboptimal feeding and immediately after moulting (Mercier *et al.* 2006). Perazzolo *et al.* (2002) reported

that the agglutinating titer of *F. paulensis* serum was extremely variable and did not show any correlation with salinity in the stressful conditions tested and that the protein concentration of shrimps kept at low salinity did not show a pronounced decrease.

In the present study, stocking densities seem not to have affected AA. No significant difference in AA was found in infected shrimp grown at different salinities and stocking densities, but AA was significantly lower in healthy shrimp cultured in medium salinity. Although the IHHNV infection rate was higher in both stressful conditions, there was no significant difference in AA between healthy and infected shrimp cultured at the same salinity and stocking density.

Different immune response parameters of cultured shrimp have been studied (Rodriguez & Le Moullac 2000) but clotting time (CT) under stressful conditions has been little investigated. Dean and Vernberg found that temperature affects clotting times, total hemocyte number and plasma protein levels in the hermit crab, *Uca pugilator* (Le Moullac & Haffner 2000). With respect to coagulation time and THC in infected shrimp, Yoganandhan *et al.* (2002) observed significant THC reductions in WSSV-infected shrimp, and a failure of hemolymph from WSSV-infected *P. indicus* shrimp to clot. The clotting time of *P. monodon* with a heavy viral load when fed on a diet devoid of immunostimulants was higher when compared to the immunostimulant incorporated diet fed shrimps (Citarasu *et al.* 2006). There are no studies about CT associated to different salinities and stocking densities.

In the present study, lower CT was found in healthy and IHHNV-infected shrimp cultured at low salinity and intensive stocking density and under these stressful conditions, a higher IHHNV-infection rate was also observed. Our CT data differ from those of the aforementioned authors, who showed a CT increase in infected shrimp.

It is necessary to emphasize that our results were obtained from shrimp reared in ponds where several parameters were acting simultaneously, unlike the other results observed

in shrimp kept under laboratory conditions where the parameters can be well controlled. Thus, further studies on the influence of other environmental factors on the immune parameters of pond-cultured shrimp are needed.

In conclusion, the present study found that the stressful conditions of low salinity and intensive stocking density decreased the resistance of *L. vannamei* to IHHNV infection. Low salinity significantly increased THC and decreased CT, but did not affect the AA of healthy and infected shrimp. The stocking density did not affect the THC, AA and CT of healthy and infected shrimp. Our results indicated that culture intensification leads to a tendency toward THC increase and CT decrease in infected shrimp, and AA decrease in healthy and infected shrimp. The IHHNV infection did not affect any immune parameters of shrimp cultured at different salinities and stocking densities. Variations in the immune parameters found in the present study among the three levels of salinity and stocking density could be explained by the various environmental factors acting simultaneously in the ponds.

### **Acknowledgements**

Support for this research was provided by ETENE/FUNDECI-BNB and the Ministry of Science and Technology (MCT), Brazil.

### **References**

- Arnold S.J., Sellars M.J., Crocos P.J. & Coman G.J. (2006) An evaluation of stocking density on the intensive production of juvenile brown shrimp (*Penaeus esculentus*). *Aquaculture* **256**, 174–179.
- Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D. L. & Santos, A. S. (2005) Bioestat 4.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Sociedade Civil Mamirauá.



- Bachère E. (2000) Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* **191**, 3–11.
- Bachère E., Destoumieux D. & Bulet P. (2000) Penaidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture* **191**, 71–88.
- Bachère E., Mialhe E. & Rodriguez J. (1995) Identification of defence effectors in the haemolymph of crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. *Fish and Shellfish Immunology* **5**, 597–612.
- Bonami J.R., Trumper B., Mari J., Brehelim M. & Lightner D.V. (1990) Purification and characterization of IHHNV virus of penaeid shrimps. *Journal Genetic Virology* **71**, 2657–2664.
- van de Braak C.B.T, Faber R. & Boon J.H. (1996) Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1978) haemolymph. *Comparative Haematology International* **6**, 194–203.
- Brock J. & Main K.L. (1994) A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. *World Aquaculture Society* p. 242.
- Cheng W.T. & Chen J.C. Effects of intrinsic and extrinsic factors on the haemocyte profile of the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* **11**, 53–63.
- Cheng W. & Chen J.-C. (2000) Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 387–391.

Cheng W., Chen S.-M., Wang F.-I., Hsu P.-I., Liu C.-H. & Chen J.-C. (2003) Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytosis activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* **219**, 111–121.

Cheng W., Juang F.M. & Chen J.C. (2004) The immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 295–306.

Chim L., Bouveret R., Lemaire P. & Martin J.L.M. (2003) Tolerance of shrimp *Litopenaeus stylirostris*, Stimpson 1894, to environmental stress-interindividual variability and selection potential for stress-resistant individuals. *Aquaculture Research* **34**, 629–632.

Citarasu T., Sivaram V., Immanuel G., Rout N. & Murugan V. (2006) 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 and Shellfish Immunology* **21**, 372–384.

Cominetti M.R., Marques M.R.F, Lorenzini D.M., Löfgren S.E, Daffre S. & Barracco MA. (2002) Characterization and purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Development Comparative Immunology* **26**, 715–721.

Destoumieux D., Muñoz M., Bulet P. & Bachere E.(2000) Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). *Cell Molecular Life Science* **57**, 1260–1271.

FAO (2006) *Food and Agricultural Organization of the United Nations*. State of World Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 500. 134 pp. Advanced Copy, Rome, Italy.

Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway Jr. C.A. & Ezekowitz R.A.B. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313–1318.

Holmblad T. & Söderhäll K. (1999) Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture* **172**, 111–123.

Jiang L.-X., Pan L.-Q. & -BO F. (2005) Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* **18**, 185–188.

Johansson M.W., Keyser P., Sritunyalucksana K. & Söderhäll K. (2000) Crustaceans hemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* **191**, 45–52.

Johansson M.W. & Söderhäll K. (1985) Cellular immunity in crustaceans and the proPO system. *Parasitology today* **6**, 171–176.

Johnston D., Melville-Smith R., Hendriks B., Maguire G.B. & Phillips B. (2006) Stocking density and shelter type for the optimal growth and survival of western rock lobster *Panulirus cygnus* (George). *Aquaculture* **260**, 114–127.

Kautsky N., Rönnback P., Tedengren M. & Troell M. (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* **191**, 145–161.

Le Moullac G. & Haffner P. (2000) Environmental factors affecting immune response in crustacea. *Aquaculture* **191**, 121–131.

Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D, Ansquer D., Avarre J.C. & Levy P. (1998) Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish and Shellfish Immunology* **8**, 621–629.

Lee S.Y. & Söderhäll K. (2002) Early events in crustacean innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology* **12**, 421–437.

Li Y., Li J. & Wang Q. (2006) The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in chinese shrimp *Feneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* **256**, 608–616.

Lightner D.V. & Redman R.M. (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture* **164**, 201–220.

Liu C.-H. & Chen J.-C. (2004) Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* **16**, 321–334.

Lo C.-F., Ho C.-H., Chen C.H., Liu K.F., Chiu Y.L. & Yeh P.-Y. (1997) Detection and tissue tropism of white spot syndrome baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with a special emphasis on reproductive organ. *Disease of Aquatic Organisms* **30**, 53–72.

Lorenzon S., Guarrini S., Smith V.J. & Ferrero E.A. (1999) Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. *Fish and Shellfish Immunology* **9**, 31–50.

Maggioni D.G.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.

Marques M.R.F. & Barracco M.A. (2000) Lectins, as non-self-recognition factors, in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 23–44.

Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova A.I., Tovar-Ramírez D., Hernández-Herrera R. & Racotta I.S. (2006) Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. *Aquaculture* **258**, 633–640.

Montaño-Perez K., Yepiz-Plascencia G., Higuera-Ciapara I. & Vargas-Albores F. (1999) Purification and characterization of the clotting protein from the white *Penaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **122**, 381–387.

Motesdeoca M., Amano Y., Echeverria F., Betancourt I., Panchana F., Sotomayor M. & Rodríguez J. (2002) 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* **1**, 38–42.

Muñoz M., Cedeño R., Rodríguez J., van der Knaap W.P.W, Mialhe E. & Bachère E. (2000) Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture* 191, 89–107.

Muta T. & Iwanaga S. (1996) The role of hemolymph coagulation in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 8, 41–47.

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.

Person M., Cerenius L. & Soderhall K. (1987) The influence of haemocytes number on the resistance of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomyces astaci*. *Journal of Fish Disease* 10, 471–477.

Ponce-Palafox J., Martinez-Palacios C.A. & Ross L.G. (1997) The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture* 157, 107– 115.

Ratcliffe N.A. (1985) Invertebrate immunity – a primer for the non-specialist. *Immunology Letters* 10, 253–270.

Rendón L. & Balcázar J.L. (2003) Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista Aquatic* 19, 27–33.

Rodríguez J., Cedeño R., Molina C., Otero V., Valenzuela E. & Sotomayor M.A. (2000) Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: *Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, pp. 57–71. Memórias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Mérida, Yucatán.

Rodriguez J. & Le Moullac G. (2000) State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. *Aquaculture* **191**, 109–119.

Romano N. & Zeng C. (2006) The effects of salinity on the survival, growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture* **260**, 151–162.

Rosas C., Cuzon G., Gaxiola G., Pascual C., Taboada G., Arena L. & van Wormhoudt A. (2002) An energetic and conceptual model of the physiological role of dietary carbohydrates and salinity on *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology* **268**, 47–67.

Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring: Harbor Laboratory, New York.

Sanguinetti C.J., Dias Neto E. & Simpson A.J.G. (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* **175**, 915–916.

Söderhäll K. & Cerenius L. (1992) Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases* **3**–23.

Sritunyalucksana K., Sithisarn P., Withayachumnarnkul B. & Flegel T.W. (1999) Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. *Fish and Shellfish Immunology* **9**, 21–30.

Sritunyalucksana K. & Söderhäll K. (2000) The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture* **191**, 53–69.

Tang K.F.J. & Lightner DV. (2001) Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. *Disease of Aquatic Organisms* **44**, 79–85.

Theopold U., Schmidt O., Söderhäll K. & Dushay M.S. (2004) Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. Review. *Trends in Immunology* **6**, 289–294.

Tseng I.-T. & Chen J.-C. (2004) The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. *Fish and Shellfish Immunology* **17**, 325–333.

Villarreal H., Hernandez-Llamas A. & Hewitt R. (2003) Effect of salinity on growth, survival and oxygen consumption of juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). *Aquaculture Research* **34**, 187–193.

Wang L.-U. & Chen J.-C. (2005) The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology* **18**, 269–278.



Wang L.-U & Chen J.-C. (2006) Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish and Shellfish Immunology* **20**, 671–681.

Yoganandhan K., Thirupathi S. & Sahul Hameed A.S. (2002) Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virusinfected shrimp, *Penaeus indicus*. *Aquaculture* **62**, 1–11.

Zhang Z.F., Shao M. & Kang K.H. (2006) Classification of haemotopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish and Shellfish Immunology* **21**, 159–169.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, T.P.; LIGHTNER, D.V.; ROCHA, I.P. Enfermidades: métodos de diagnóstico e medidas de prevenção a serem aplicadas na carcinicultura brasileira. **Revista da ABCC**, ano 8, n. 1, p. 26 - 34. março. 2006.

ARNOLD, S.J.; SELLARS, M.J.; CROCOS, P.J.; COMAN, G.J. An evaluation of stocking density on the intensive production of juvenile brown shrimp (*Penaeus esculentus*). **Aquaculture**, 256, p. 174 – 179, 2006.

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

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

BARBIERI, R.C.J.; OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos: reprodução, maturação e larvicultura**. Viçosa, MG: Aprenda fácil, 2001a. v. 1

\_\_\_\_\_. **Camarões marinhos: engorda**. Viçosa, MG: Aprenda fácil, 2001b. v. 2

BARRACCO, M.A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. de los A.P. (Ed) **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela, 2004. p. 49 - 72.

BONAMI, J.R.; TRUMPER, B.; MARI, J.; BREHELIM, M.; LIGHTNER, D.V. Purification and characterization of IHHNV virus of penaeid shrimps. **Journal Genetic Virology**, 71, p. 2657 – 2664, 1990.

BORBA, M.G. Qualidade da água na carcinicultura marinha. In: SEMINÁRIO DE CARCINICULTURA, 1, 2004, Natal. **Anais...??** Natal: SENAI, 2004.1 CD-ROM.

BRITO, R.; CHIMAL, M.E.; ROSAS, C. Effect of salinity in survival, growth, and osmotic capacity of early juveniles of *Farfantepenaeus brasiliensis* (decapoda: penaeidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 244, p. 253 – 263, 2000.

BROCK, J.; MAIN, K.L. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. **World Aquaculture Society**, USA, p. 242, 1994.

CAVALCANTI, L.B.; MACEDO, S.J.; MONTES, M.J.F. Condições hidrobiológicas associadas ao cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, na região estuarina do Rio Paraíba do Norte (Paraíba - Brasil). **Revista da ABCC**, ano 7, n. 4, p. 62 - 64. dez. 2005.

CARVALHO, W.F. **Técnicas médicas de hematologia e Imuno-hematologia**. 6.ed. Belo Horizonte: Coopmed Editora, 1994.

CHENG, W.; CHEN, J.C. Effects of pH, temperature and salinity on immune parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Fish & Shellfish Immunology**, 20, p. 387 – 391, 2000.

CHENG, W.; CHEN, S.-M.; WANG, F.-I.; HSU, P.-I.; LIU, C.-H.; CHEN, J.-C. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytosis activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture**, 219, p. 111 – 121, 2003.

CHIM, L.; BOUVERET, R.; LEMAIRE, P.; MARTIN, J.L.M. Tolerance of shrimp *Litopenaeus stylirostris*, Stimpson 1894, to environmental factors for stress-interindividual variability and selection potential for stress-resistant individuals. **Aquaculture Research**, 34, p. 629 – 632, 2003.

COMINETTI, M.R.; MARQUES, M.R.F.; LORENZINI, D.M.; LÖFGREN, S.E.; DAFFRE, S.; BARRACCO, M.A. Characterization and purification of a lectin from the hemolymph of the white shrimp *Litopenaeus schmitti*. **Developmental and Comparative Immunology**, 26, p. 715 - 721, 2002.

CONSELHO NACIONAL DE SECRETÁRIOS DE ESTADO DA ADMINISTRAÇÃO. **Mapa Rio Grande do Norte**. Disponível em: <<http://www.consad.rn.gov.br/imagens/rio-grande-norte.gif>>. Acesso em 21 novembro 2007.

CUESTA, A.; LAIZ-CARRIÓN, R.; MARTIN DEL RÍO, M.P.; MESEGUER, J.; MANCERA, J.M.; ESTEBAN, M.A. Salinity influences the humoral immune parameters of *Gilthead seabream (Sparus aurata L.)*. **Fish & Shellfish Immunology**, 18, p. 255 – 261, 2005.

DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical haematology**. 8. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1995.

DHAR, A.K.; ROUX, M.M.; KLIMPEL, K.R. Detection and quantification of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus and White Spot Virus in shrimp using real-time quantitative PCR and SYBR green chemistry. **J. Clin. Microb.**, v. 39, p. 2835 - 2845, 2001.

DRAHOS, D.I. O potencial para a inoculação de bactérias nitrificadoras para controlar a amônia e o nitrito em viveiros de camarões. **Revista da ABCC**, ano 8, n. 1, p. 35 - 37. março. 2006.

FONSECA, C.; ROCHA, I.P. Cartilha de boas práticas de manejo para prevenir e controlar enfermidades do camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil. Recife, 2004. 28 p. (ABCC – organizadores).

HERNÁNDEZ, J.Z.; NUNES, A.J.P. Biossegurança no cultivo marinho: incidência de enfermidade e métodos de diagnóstico. **Revista da ABCC**, ano 3, n. 1, p. 48 - 51, abr., 2001.

HOFFMANN, J.A.; KAFATOS, F.C.; JANEWAY Jr, C.A. EZEKOWITZ, R.A.B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313 - 1318, maio. 1999.

HOLMBLAD, T.; SÖDERHÄLL, K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture**, 172, p.111 - 123, 1999.

IDEMA. Desenvolvimento sustentável. **Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente**, ano 1, n 1, 6 p., fevereiro, 2006.

JIANG, L.-X.; PAN, L.-Q.; -BO, F. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, 18, p. 185 - 188, 2005.

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

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

JOHNSTON, D; MELVILLE-SMITH, R.; HENDRIKS, B.; MAGUIRE, G.B; PHILLIPS, B. Stocking density and shelter type for the optimal growth and survival of western rock lobster *Panulirus cygnus* (George). **Aquaculture**, 260, p. 114 - 127, 2006.

JORY, D.E.; DUGGER, D.M. Manejo preventivo de doenças em camarões peneídeos. **Revista da ABCC**, ano 2, n. 1, p. 46 - 52. abr. 2000.

KAUTSKY, N.; RÖNNBACK, P.; TEDENGREN, M.; TROELL, M. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, 191, p. 145 – 161, 2000.

LEE, S.Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & Shellfish Immunology**, 12, p. 421 - 437, 2002.

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

LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune response in crustacea. **Aquaculture**, 191, p. 121 - 131, 2000.

LI, Y.; LI, J.; WANG Q. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, 256, p. 608 – 616, 2006.

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

LIU, B.; YU, Z.; SONG, X.; GUAN, Y.; JIAN, X.; HE, J. The effect of acute salinity change on white spot syndrome (WSS) outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, 253, p. 163 – 170, 2006.

LIU, C.-H.; CHEN, J.-C. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 16, p. 321 - 334, 2004.

LUCIEN-BRUN, H. Controle da melanose e pontos negros através do uso correto do metabissulfito de sódio. **Revista da ABCC**, ano 8, n. 1, p 45 - 47. março 2006.

McGRAW, W.; SCARPA, J. Mortality of freshwater – acclimated *Litopenaeus vannamei* associated with acclimation rate, habituation period, and ionic challenge. **Aquaculture**, 236, p. 285- 296, 2004.

MAGGIONI, D.G.S.; ANDREATTA, E.R.; HERMES, E.M.; BARRACCO, M.A. 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, p. 501 – 515, 2004.

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

MARTINS, P.C.C. **Influência das condições ambientais e das técnicas do manejo de produção sobre a ocorrência de enfermidades no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no Estado do Ceará.** 2003. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2003.

MERCIER, L.; PALACIOS, E.; CAMPA-CÓRDOVA, A.I.; TOVAR-RAMÍREZ, D.; HERNÁNDEZ-HERRERA, R.; RACOTTA, I.S. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture**, 258, p. 633 – 640, 2006.

MORE, W.R.; FRELIER, P. Administração da saúde dos camarões. **Revista da ABCC**, ano 4, n. 3, p. 26 - 31, dez. 2002.

MOTESDEOCA, M.; AMANO, Y.; ECHEVERRIA, F.; BETANCOURT, I.; PANCHANA, F.; SOTOMAYOR, M.; RODRÍGUEZ, J. La respuesta inmunitaria celular del camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad em el control de la enfermedad em los estanques. **El Mundo Aquicola**, v. 8, n. 1, p. 38 – 42, 2002.

MOTTE, E.; YUGCHA, E.; LUZARDO, J.; CASTRO, F.; LECLERCQ, G.; RODRÍGUEZ, J.; MIRANDA, P.; BORJA, O.; SERRANO, J.; TERRENOS, M.; MONTALVO, K.; NARVÁEZ, A.; TENORIO, N.; CEDEÑO, V.; MIALHE, E.; BOULO, V. Prevention of IHNV vertical transmission in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, 219, p. 57 - 70, 2003.

MUTA, T.; IWANAGA; S. The role of hemolymph coagulation in innate immunity. **Current Opinion in Immunology**, 8, p 41 - 47, 1996.

NUNAN, L. M.; POULOS, B.T.; LIGHTNER, D. V. Use of Polymerase Chain reaction for the Detection of Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus in Penaeid Shrimp. **Marine Biotechnol**, v. 2, p. 319-328, 2000.

NUNES, A.J.P. Nutrição e alimentação. In: SEMINÁRIO DE CARCINICULTURA, 1, 2004, Natal. **Anais...** Natal: SENAI, 2004.1 CD-ROM.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüicultura**, p. 23 -33, jul/ago, 2002.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüicultura**, p. 37 – 51, maio/ jun. 2004.

OLIVEIRA, D.B.F. et al. **Guia do empreendedor em carcinicultura**. Natal: EMPARN, 2003.

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

PEREGRINO, L.H; ROCHA, I.P.; ALENCAR, R.B. Observações técnicas sobre o cultivo do camarão marinho (*Litopenaeus vannamei*) em águas de baixa salinidade. **Revista da ABCC**, ano 8, n. 1, p. 48 - 53. dez. 2005.

PÉREZ-FARFANTE, I; KENSLEY, B. Penaeoid and sergestoid shrimps and prawns of the world. Keys and diagnoses for the families and genera. **Éditions du Muséum Paris**, 175, p. 1 – 79, 1997.

PONCE-PALAFIX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C.A.; ROSS, L.G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, 157, p. 107 – 115, 1997.

RATCLIFFE, N.A. Invertebrate immunity – a primer for the non-specialist. **Immunology Letters**, 10, p. 253 - 270. 1985.

RENDÓN, L.; BALCÁZAR, J.L. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. **Revista Aquatic**, 19, p. 27 – 33, 2003.

ROCHA, I.P. O agronegócio do camarão marinho cultivado. **Encarte da ABCC**. Julho, 2002.

ROCHA, I.P.; RODRIGUES, J.; LEITE, L. Carcinicultura brasileira: o censo de 2003. **Panorama da Aqüicultura**. v. 14, n. 82, mar/abr, 2004.

ROCHA, I.P. Agro-negocio de camarón cultivado em Brasil: uma realidade. **Panorama Acuicola**, v. 5, n. 5, p. 34 -35. jul/ago 2000.

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

RODRÍGUEZ, J.; CEDEÑO, R.; MOLINA, C.; OTERO, V.; VALENZUELA, E.; SOTOMAYOR, M.A. Efecto de la calidad de la dieta sobre la respuesta inmune del camarón *Penaeus vannamei*. In: SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, México. **Memórias del V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA**. Mérida, Yucatán, 2000. p. 57 - 71.

ROMANO, N.; ZENG, C. The effects of salinity on the survival, growth and haemolymph osmolality of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*. **Aquaculture**, 260, p. 151 – 162, 2006.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamida gels. **Biotechniques**, v. 17, p. 915-916, 1994.

SANTOS, M.L.; CARVALHO, R.; ALENCAR, R.; ROCHA, I.P. Programa de Biossegurança para fazendas de camarão marinho. 1, ed. Recife, 2005. 68 p. (ABCC – Organizadores)

SIQUEIRA, J.F.J.; DANTAS, C.J.S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: Médica Científica, 2000.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Ann. Rev. Fish Diseases**. p. 3 - 23, 1992.

SNOWDON, C.T. O significado da pesquisa em comportamento animal. **Estudos da psicologia**, v. 4, n. 2, p. 365 - 373, 1999.

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

SRITUNYALUCKSANA, K.; SITHISARN, P.; WITHAYACHUMNARNKUL, B.; FLEGEL, T.W. Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants. **Fish & Shellfish Immunology**, 9, p. 21 - 30, 1999.

STEINER, H.; HULTMAR, D.; ENGSTRÖM, A.; BENNICH, H.; BOMAN, H.G. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, 292, p. 246 - 248, 1981.

TANG, K.F.T.; LIGHTNER, D.V. Detection and quantification of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp by real-time PCR. **Dis. Aquat. Org.**, v. 44, p. 79-85, 2001.

THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M.S. Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing. **Review. Trends in Immunology**, v. 25, n. 6, p. 289 - 294, June 2004.

TSENG, I.-T.; CHEN, J.-C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. **Fish & Shellfish Immunology**, 17, p. 325 - 333, 2004.

VAN DE BRAAK, C.B.T.; FABER, R.; BOON, J.H. Cellular and humoral characteristics of *Penaeus monodon* (Fabricius, 1778) haemolymph. **Comparative Haematology International**, 6, p. 194 - 203, 1996.

VARGAS-ALBORES, F.; YEPIZ-PLASCENCIA, G. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture**, 191, p. 13 - 21, 2000.

VILLARREAL, H.; HERNANDEZ-LLAMAS, A.; HEWITT, R. Effect of salinity on growth, survival and oxygen consumption of juvenile Brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes). **Aquaculture Research**, 34, p. 187 - 193, 2003.

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

WANG, L.-U.; CHEN, J.-C. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. **Fish & Shellfish Immunology**, 20, p. 671 - 681, 2006a.



WICKINS, J.F.; O'C LEE, D. **Crustacean farming; ranching and culture**. 2. ed. USA: Blackwell Scienc, 2002.

YANG, B.; SONG, X-L.; HUANG, J.; SHI, C-Y.; LIU, L. Evidence of existence of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeis shrimp cultured in China. **Veterinary Microbiology**, 120, p. 63 – 70, 2007.

ZHANG, Z.F.; SHAO, M.; KANG, K.H. Classification haemotopoietic cells and haemocytes in Chinese prawn *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, 21, p. 159 – 169, 2006.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)