



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

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA
MACROALGA *Gracilaria birdiae* SOBRE AS CONDIÇÕES DE
IMUNOCOMPETÊNCIA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* INFECTADOS
COM O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

LIEGE CANTELLI

FLORIANÓPOLIS

2009



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

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA
MACROALGA *Gracilaria birdiae* SOBRE AS CONDIÇÕES DE
IMUNOCOMPETÊNCIA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* INFECTADOS
COM O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

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

Orientadora: Dra Margherita Anna Barracco

Coorientadora: Dra Luciane Maria Perazzolo

LIEGE CANTELLI

FLORIANÓPOLIS

2009

Cantelli, Liege,

Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) / Liege Cantelli – 2009.

68 f : 9 fig.

Orientadora: Dra Margherita Anna Barracco
Coorientadora: Dra Luciane Maria Perazzolo

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

1.*Litopenaeus vannamei*; 2.imunologia de crustáceos; 3.polissacarídeos sulfatados de macroalgas; 4.imunoestimulante; 5.parâmetros hemato-imunológicos; 6.vírus da mancha branca.

Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).

Por

LIEGE CANTELLI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

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

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

Banca Examinadora:

Dra. Margherita Anna Antônia Maria Barracco - *Orientadora*

Dr. Carlos Roberto Zanetti

Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a **Deus**, pela vida, pelas oportunidades e principalmente pelas pessoas maravilhosas que ele colocou em meu caminho e que foram fundamentais no meu crescimento e aprendizado.

Agradeço a professora **Dra. Luciane Perazzolo**, pela orientação, companheirismo, pelos ensinamentos e principalmente por todo conhecimento a mim transmitido.

Agradeço a professora **Dra. Margherita Barracco**, pelos conselhos, pela atenção, conhecimentos transmitidos e ótimas conversas sobre gatos.

Ao professor **Wladmir** do laboratório BIOMAR pelos polissacarídeos testados neste estudo.

Ao professor **Zanetti** do LIA pela gentil colaboração na definição do protocolo de diluição viral.

Agradeço ao **Giovani de Mello** e aos proprietários da fazenda, e também ao pessoal da fazenda experimental **Yakult** do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC pelo fornecimento dos animais utilizados no experimento.

Ao professor **Paulo Ogliari** e ao **Geison** pela importante ajuda com a estatística.

Agradeço a **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura, pela ajuda, carinho, amizade, paciência, ótimos encontros e churrascos. Em especial aos meus amigos do coração **Paulinha, Cris, Mirian, Pri, Nana, Andrezza, Dani, Pedro** e a eterna casulo **Claudinha** por todo apoio dentro e fora do laboratório, pelas ótimas festas, grandes comilanças, e momentos engraçados. Ao **Delano** e **Maurício**, por toda ajuda, momentos descontraídos e apoio nos meus dias em Araquari. Ao **Rafanildo** e a **Mirella**, pela ajuda incondicional, carinho, paciência e ótimos conselhos, e aos novatos, **Gabi** e **Érik**, pelo curto, porém, gratificante convívio. Aos professores **Rogério** e **Eduardo**, por toda ajuda extra.

A todos do Colégio Agrícola de Araquari. A **diretoria**, que me forneceu a estrutura do colégio para realização dos meus experimentos, sem a qual, este trabalho não teria sido possível. A **Ana** e ao **Sr. Moreira**, que além de me auxiliarem nos cuidados com os animais também tornaram os momentos no laboratório mais divertidos. E é claro a todos os meus novos amigos **Stela, Érica, Fernanda, Robert** e **Jonas** por toda ajuda e carinho durante minha estada em Araquari.

Ao **Carlito** por estar sempre disposto a ajudar em tudo, quebrando inúmeros galhos.

Agradeço de todo coração aos meus grandes amigos que me acompanham desde os bons tempos da graduação em veterinária, em especial **Renata, Júlio, Andressa, Iona, Yuri, Carlos, Everton, Aline, Jerusa e Raquel**, por todo apoio, carinho, compreensão e amizade sem fim.

Aos meus novos amigos e colegas do mestrado, em especial a **Raquel**, por toda amizade, ajuda e carinho, a **Bel** minha amiga e companheira desde o dia da prova do mestrado, a **Gominho, Rodrigo**, por toda ajuda, carinho e amizade, a **Gi, Fernando, Tarcísio, PA, Michi, Nick, Vitor Pontinha, Renata, Renato**, pelas ótimas festas e bons momentos de convívio.

As minhas queridas amigas **Kelen, Eveline e Beni** que estão ao meu lado em tudo me dando apoio e carinho sempre.

A minha cachorrinha **Mel**, minha fiel companheira de todos os momentos, que me acompanha sem reclamar em todas as minhas mudanças de casa e de humor.

Em especial a minha família, meus irmãos **Geisa, Sivan e Dioni** vocês sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e projetos, estando ao meu lado em todas as minhas conquistas e realizações me dando apoio moral e financeiro. Esse grande amor que existe entre nós jamais ira mudar.

Aos meus avós **Maria e Fiorelo**, que são pra mim como meus segundos pais, pelo amor incondicional dedicado a mim e a meus irmãos, e aos meus avós **Oliva e Vitório** *in memoriam* por todo amor dedicado a nós durante toda sua vida.

Aos novos membros da minha família, minhas cunhadas **Manu e Raquel** que são pessoas especiais e muito queridas por nós, e é claro ao meu sobrinho **Gabriel** um anjo que veio pra iluminar e trazer ainda mais amor a nossas vidas.

Aos meus queridos e amados pais, **Iracema e Antenor**, que são a minha base, meu porto seguro, com quem posso contar em todos os momentos, os ensinamentos, educação e amor que recebi de vocês moldaram meu caráter e vão me acompanhar por toda vida.

Enfim, obrigada a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).....	16
Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos	17
Substâncias imunoestimulantes: polissacarídeos sulfatados (PS)	23
Objetivo Geral	27
1. Introdução.....	31
2. Material e métodos.....	33
2.1. Preparo da ração suplementada com polissacarídeos sulfatados extraídos de <i>Gracilaria birdiae</i> (PS) e determinação da melhor concentração de PS na ração.....	33
2.2. Animais e Desenho Experimental.....	33
2.2.1. Preparo do inóculo com WSSV e determinação de uma DL ₅₀ correspondente a 30% de mortalidade dos animais.....	34
2.2.2. Infecção experimental dos camarões com WSSV.....	35
2.2.3. Detecção do WSSV, através da amplificação do DNA viral por PCR.....	35
2.3. Coleta de hemolinfa e análise dos imunoparâmetros	36
2.3.1. Contagem Total (CTH) e Diferencial de Hemócitos (CDH).....	37
2.3.2. Atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina (α 2M) – Ensaio de proteção de protease.....	37
2.3.3. Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido (O_2^-)	37
2.3.4. Atividade da fenoloxidase (PO)	38
2.3.5. Avaliação da capacidade aglutinante da hemolinfa	38
2.3.6. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)	38
2.3.7. Análise Estatística	38
3. Resultados.....	39
3.1. Detecção do DNA viral (WSSV) no inóculo e tecidos dos animais injetados.....	39
3.2. Determinação da diluição do inóculo para a infecção experimental	39
3.3 Análise dos Imunoparâmetros	40
3.3.1. Contagem Total de Hemócitos (CTH)	40
3.3.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH).....	41
3.3.3. Atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina (α 2M) – Ensaio de proteção de protease.....	41
3.3.4. Quantificação da produção intracelular de ânion superóxido (O_2^-)	42
3.3.5. Atividade da fenoloxidase (PO).....	44
3.3.6. Atividade aglutinante da hemolinfa.....	44
3.3.7. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)	45
3.4. Consumo alimentar e taxa de mortalidade cumulativa dos animais	46
4. Discussão	47
5. Referências	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO	61

LISTA DE FIGURAS

Introdução

- Figura 1:** *Espécimen* de camarão branco-do-pacífico, *Litopenaeus vannamei*..... 14
- Figura 2:** Principais países produtores de *L. vannamei* (Estatísticas Pesqueiras da FAO, 2004).. 14
- Figura 3:** Morfologia do vírion da síndrome da mancha branca (WSSV) (a). Microscopia eletrônica mostrando o vírion com uma estrutura semelhante a uma “cauda” (setas pretas) (barra = 250 nm) (b). (Foto adaptada de Durand et al., 1996)..... 17
- Figura 4:** Híbridos de DL-galactana. (a) Domínio carragenana; (b) Zona de junção; (c) Domínio da agarana (DAMONTE *et al.*, 2004)..... 25
- Figura 5:** Exemplar da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* (Fonte: <http://peixes.brasilmergulho.com.br/thumbnails.php>)..... 25

Artigo científico

- Figura 1.** Esquema explicativo do desenho experimental. Início do experimento corresponde ao início da alimentação por 18 dias com ração acrescida (grupo PS+) ou não (grupo PS-) com PS; **18° dia:** primeira coleta de hemolinfa (Dia 0 pré-infecção), seguida por injeção dos animais com solução contendo vírus da mancha branca (WSSV) (T1 e T2) ou não (T3 e T4); **21° dia:** segunda análise imunológica, correspondendo ao **3° dia pós-infecção**; **32° dia:** terceira análise, correspondendo ao **14° dia pós-infecção**..... 34
- Figura 2.** Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) do fragmento amplificado (375 pb) correspondente a proteína de envelope VP19 do WSSV. **M:** marcador de peso molecular (100 pb); **1:** controle positivo (*L. vannamei* infectado com WSSV) ; **2:** Inóculo de WSSV utilizado no experimento..... 39
- Figura 3.** Contagem total de hemócitos (CTH) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Os animais do grupo “**PS+**” (Dia 0, pré-infecção) foram alimentados com polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria birdiae* (PS) por 18 dias e, em seguida, infectados (**T1**) ou não (**T3**) com WSSV. Os animais do grupo “**PS-**” foram alimentados com ração sem PS e após, infectados (**T2**) ou não (**T4**) com WSSV. As barras representam à média \pm DP da CTH (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CTH de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CTH dos animais tratados com PS (PS+, T1, T3) analisadas em separado dos animais tratados sem PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento..... 40
- Figura 4.** Porcentagem de hemócitos granulares (HG) e hialinos (HH) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção dos animais com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a DHC de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as DHC dos animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisadas em separado dos animais tratados sem PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da DHC dentro do mesmo tratamento, após injeção..... 41
- Figura 5.** Atividade da $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2M$) em *L. vannamei* mensurada através do ensaio de proteção de protease nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP da atividade da $\alpha 2M$ (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade da $\alpha 2M$ de todos os tratamentos, dentro de

cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade da $\alpha 2M$ entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade da $\alpha 2M$ entre os tratamentos após a injeção..... 42

Figura 6. Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* estimulados *in vitro* por um dos indutores laminarina ou LPS (lipopolissacarídeo) e quantificada através do método de redução do NBT, nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção dos animais com WSSV. As barras representam à média \pm DP da produção intracelular de O_2^- ($n=12$ /análise/tratamento). Letras minúsculas representam a estimulação celular significativa ($p \leq 0,05$) pelo indutor em relação à produção basal, dentro de cada tratamento e em cada análise..... 43

Figura 7. Atividade da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com WSSV. As barras representam à média \pm DP da atividade da PO (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade da PO de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade da PO entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade da PO entre os tratamentos, após a injeção..... 44

Figura 8. Atividade aglutinante do soro de camarões, contra eritrócitos de cão em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP da atividade hemaglutinante (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade aglutinante em todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade aglutinante entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade aglutinante entre os tratamentos, após a injeção.... 45

Figura 9. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) de *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o WSSV). As barras representam à média \pm DP da CP (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a CP de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da CP entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da CP entre os tratamentos, após a injeção..... 46

LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha 2M$ – $\alpha 2$ - Macroglobulina

$A_{260/280nm}$ – Razão da absorbância 260/280 nm

AC1 – Anticoagulante 1

AC2 – Anticoagulante 2

BAPNA – $N\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride

BSA – Albumina de soro bovino

$CaCl_2$ – Cloreto de cálcio

CDH – Contagem diferencial de hemócitos

CMV – *Cytomegalovirus* (Citomegalovírus)

CP – Concentração de proteínas totais da hemolinfa

CTH – Contagem total de hemócitos

DMSO - Dimetil sulfóxido

dsRNA – *Double-stranded* (RNA dupla fita)

EDTA – *Ethylene diamine tetracetic acid* (Ácido diamino tetracético)

H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio

HG – Hemócitos granulares

HGG – Hemócitos com grânulos grandes

HGP – Hemócitos com grânulos pequenos

HH – Hemócitos hialinos

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da imunodeficiência humana)

HOCl – Ácido hipocloroso

HSV – *Herpes Simplex Virus* (Herpes vírus simples)

IHHNV – *Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* (Vírus da Necrose Hipodérmica e Hematopoiética)

IMNV – *Infectious Myonecrosis Virus* (Vírus da Mionecrose Infecciosa Muscular)

KCl – Cloreto de potássio

KOH – Hidróxido de potássio

LBP – Proteína que se liga a LPS

L-DOPA – L-dihidroxifenilalanina

LGBP – Proteína que se liga a ambos β -glicanas e LPS

LPS – Lipopolissacarídeos

MAS – *Modified Alsever solution* (Solução anticoagulante Alsever modificada)

MCF – Microscopia de contraste de fase

$MgCl_2$ – Cloreto de magnésio

MI – Microscópio Invertido

MOP – Mieloperoxidase

NaCl – Cloreto de sódio

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

$NaHCO_3$ – Bicarbonato de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio
NBT – *Nitroblue tetrazolium*
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
 $\cdot\text{OH}$ – Radical hidroxila
 $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singlet
 O_2^- – Ânion superóxido
 OH^- – Ânion hidroxila
OIE – Organização mundial para saúde animal
 ONOO^- – Peroxinitrito
p – Nível de probabilidade
PAM – Peptídeos antimicrobianos
PAMPs – Padrões moleculares associados aos patógenos
pb – Pares de base
PBS – *Phosphate buffer solution* (tampão fosfato salino)
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PG – Peptidoglicanas
PMA - *Phorbol myristate acetate*
PO – Fenoloxidase
proPO – Pró-fenoloxidase
PRPs – Proteínas de reconhecimento-padrão
PS – Polissacarídeo sulfatado
RNIs – Intermediários reativos de nitrogênio
ROIs – Intermediários reativos de oxigênio
SDS – *Sodium dodecyl sulfate*
SINV – *Sindbis Virus* (Vírus Sindbis)
SOD – Superóxido dismutase
SS-P – Solução Salina para *Penaeus*
TBS – *Tris buffer solution* (Tampão de Tris salino)
TSV – *Taura Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome de Taura)
U – Unidade internacional de atividade enzimática
UV – Ultravioleta
WSS – *White Spot Syndrome* (Síndrome da Mancha Branca)
WSSV – *White Spot Syndrome Virus* (Vírus da Síndrome da Mancha Branca)
YHV – *Yellow Head Virus* (Vírus da Cabeça Amarela)

RESUMO

O efeito dos polissacarídeos sulfatados (PS), extraídos da macroalga *Gracilaria birdiae*, foi testado sobre a imunocompetência do camarão *Litopenaeus vannamei* através da alimentação dos animais com ração contendo 0,3% de PS, seguido por desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (0,35 DL₅₀). A hemolinfa foi coletada nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com WSSV e utilizada para avaliar alguns parâmetros hemato-imunológicos. Os resultados sugerem uma aparente estimulação da atividade da fenoloxidase e da capacidade aglutinante no dia 14 pós-infecção. O número total de hemócitos (CTH) diminuiu (40%) nos camarões alimentados com a dieta controle (sem PS), mas manteve-se estável nos animais tratados com PS. A porcentagem de hemócitos granulares diminuiu (30%) em todos os grupos desafiados, independentemente da presença de PS. Esses resultados sugerem uma estimulação na produção de hemócitos hialinos associada ao tratamento com PS, uma vez que a CTH não foi alterada. Além disso, verificou-se um aumento na atividade da α 2-macroglobulina e na produção de ânion superóxido em todos os camarões infectados (dias 3 e 14) independente do tratamento com PS. Embora a dieta contendo PS não tenha resultado em imunoestimulação importante nos camarões, os animais desafiados com WSSV apresentaram uma diminuição (11%) na mortalidade quando tratados com PS, em comparação aos da dieta controle. Curiosamente, o vírus não foi detectado nos animais desafiados com WSSV a partir do dia 3. Acredita-se que esse achado esteja relacionado ao fenômeno de interferência viral, já que os animais apresentaram-se infectados de forma latente pelo vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética (IHHNV). Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer tal fenômeno, bem como a atuação dos PS de *G. birdiae* na sobrevivência dos animais.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, sistema imune de crustáceos, imunoestimulantes, polissacarídeos sulfatados, WSSV.

ABSTRACT

In this study, we analyzed the effect of sulfated polysaccharides (SP), extracted from the macroalgae *Gracilaria birdiae*, on the immunocompetence of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. The animals were fed a diet containing 0.3% SP, prior to a challenge with the white spot syndrome virus (WSSV) (0.35 LD₅₀). Shrimp hemolymph was collected after 0, 3 and 14 days from viral inoculum and was used to evaluate some hemato-immunological parameters. The results indicated that phenoloxidase and hemmagglutinating activities were apparently immunostimulated after 14 days of viral challenge. Moreover, the total number of circulating hemocytes (THC) dropped drastically (40%) in shrimp fed control diet (deprived of SP), but remained unaltered in animals fed SP-diet. The percentage of granular hemocytes decreased considerably (30%) in all challenged shrimp groups, regardless the presence of SP in diet. Therefore, these results suggested an increase of hyaline hemocytes in SP-diet treated shrimp, since their THC did not decline. The results also showed that an elevation of α 2-macroglobulin activity and of anion superoxide production occurred in all infected shrimp (on days 3 and 14) regardless the presence of algal extract in the diet. Although SP-diet did not result in much shrimp immunostimulation, animals challenged with WSSV showed a slight decrease (11%) on their mortality rate. Curiously, WSSV-DNA was not found in infected shrimp. We hypothesized that this result was due to a viral-interference phenomenon, since the animals were found to be positive to the hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). Future studies are necessary to better elucidate this phenomenon, as well as the effect of SP from *G. birdiae* on shrimp survival.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, crustacean immune system, immunostimulants, sulfated polysaccharides, WSSV

INTRODUÇÃO

A aquicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresce em todo mundo, exercendo um importante papel no suprimento da demanda por proteína de origem animal para alimentação humana. Esta atividade, esta ligada diretamente à economia de vários países, tanto como fonte de subsistência, quanto na geração de divisas através da exportação de produtos cultivados (FAO, 2007).

Dentro da aquicultura, a carcinicultura tem se mostrado uma atividade muito promissora. Esta atividade também é responsável por milhões de empregos em países em desenvolvimento, sendo um item fundamental no setor de exportações de vários países produtores. Atualmente, os maiores exportadores mundiais de camarões estão na Ásia, entre eles Tailândia, China, Índia, Vietnam e Indonésia, sendo que na América Latina, os principais produtores são o Equador, o México e o Brasil (FAO, 2007).

No Brasil a carcinicultura teve início durante a década de 80 com a introdução do peneídeo *Marsupenaeus japonicus* no nordeste. Entretanto, apesar desta espécie, na ocasião, ser a mais cultivada na Ásia, ela não se adaptou bem às condições brasileiras, principalmente em função das baixas salinidades nas zonas de produção (BARBIERI e OSTRENSKY, 2002). Seguiram-se então tentativas para a domesticação das espécies nativas, *Litopenaeus schmitti* (OSTRENSKY, 1997) e *Farfantepenaeus paulensis* (WASIELESKY, 2000) nas regiões sul e sudeste, e *Farfantepenaeus subtilis* no norte e nordeste (TAVARES e SANTOS, 2006). No entanto, a baixa produtividade e lucratividade destas espécies levaram à desativação das fazendas.

Ainda nos anos 80 foi introduzido no nordeste do Brasil o camarão branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* (Fig. 1), sendo que na última década seu cultivo dominou a carcinicultura nacional, tendo sido introduzido também no sul do Brasil onde as águas são mais frias. O *L. vannamei* é atualmente o peneídeo mais cultivado em todo o mundo (62,08%), seguido por *Penaeus monodon* (19,15%) (E. MAIA, comunicação pessoal). As condições climáticas e ambientais encontradas no nordeste brasileiro se mostraram extremamente favoráveis ao cultivo de *L. vannamei*, sendo atualmente a região responsável por 95% da produção nacional, onde podem ser obtidas até 2,5 safras por ano (IDEMA, 2006). Em 1998 a espécie foi introduzida em Santa Catarina pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI) com o intuito de viabilizar a atividade no estado.



Figura 1: *Espécimen* de camarão branco-do-Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.

A espécie *L. vannamei* (PÉREZ-FARFANTE e KENSLE, 1997) tem uma distribuição natural que vai desde as águas do Oceano Pacífico, na província de Sonora (México), até o sul de Tumbes, no Peru. Devido às suas excelentes características zootécnicas, seu elevado grau de rusticidade no manejo, taxa de crescimento uniforme, fácil adaptabilidade e reprodução satisfatória em laboratório, este peneídeo se tornou facilmente o mais cultivado em todos os continentes (FAO, 2007) (Fig. 2).



Figura 2: Principais países produtores de *L. vannamei* (Estatísticas Pesqueiras da FAO, 2004).

Atualmente, a carcinicultura vem enfrentando sérios desafios em todo mundo, especialmente àqueles relacionados às enfermidades e à degradação ambiental. Estes fatores, juntos ou isolados, têm se agravado, devido à intensificação dos cultivos que, na maioria das vezes, não consideram os aspectos ecológicos, nem os processos fisiológicos dos animais (BACHÈRE, 2000). Sabe-se também que fatores ambientais potencialmente estressores, como alterações nos parâmetros físico-químicos da água, a presença de metais pesados, pesticidas agrícolas e poluentes no ambiente, podem alterar o sistema imune dos camarões, debilitando-os e propiciando a instalação de doenças (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000). Além disso, a água dos cultivos abriga naturalmente inúmeros microorganismos

e parasitas e, uma vez instalada a doença, a transmissão entre os animais é rapidamente veiculada (BOYD, 1979). Segundo Bonami (2008), as doenças emergentes em camarões podem ser atribuídas a três fatores primários: (1) à prática comum de introduzir nas fazendas novos reprodutores capturados na fase de pós-larva em ambiente natural, podendo ser hospedeiros de agentes patogênicos; (2) ao comércio nacional e internacional desses reprodutores de camarão no estágio de pós-larva, que são transferidos para tanques até que eles cheguem ao tamanho de mercado; e (3) ao cultivo de camarões em tanques com alta densidade, potencializando os fatores estressores e a rápida transmissão.

Os camarões podem ser alvos de ataques de parasitas, fungos, bactérias ou vírus, patógenos estes que geram enfermidades e podem causar sérias perdas econômicas aos cultivos. As principais enfermidades realmente ameaçadoras para a carcinicultura mundial são as viroses. Os vírus são os patógenos mais comumente encontrados na água do mar, estando presentes na quantidade de até 10 bilhões/L, sendo muitos deles capazes de infectar vários organismos (FUHRMAN, 1999). As infecções virais são doenças comuns em crustáceos, como os peneídeos, os quais podem ser infectados por mais de 20 diferentes tipos de vírus (LOH *et al.*, 1997), entre eles, o vírus da necrose infecciosa hipodermal e hematopoiética (IHHNV), o vírus da cabeça amarela (YHV), o vírus da síndrome Taura (TSV), o vírus da síndrome da macha branca (WSSV) e o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (LIGHTNER, 2003; NUNES *et al.*, 2004).

No caso específico do Brasil, duas viroses causaram recentemente sérios prejuízos à carcinicultura, estando estas enfermidades geograficamente separadas. No nordeste, em 2002, uma nova doença para camarões foi descrita, estando associada com baixas mortalidades dos animais nas fazendas de cultivo. Os sinais clínicos incluem áreas de necrose muscular, com aparência opaca/esbranquiçada no músculo abdominal atingido, demonstrando por vezes um aspecto de “cozido” em estágios avançados da necrose. O agente etiológico foi diagnosticado como sendo o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) (NUNES *et al.*, 2004).

Já no sul do Brasil, outra virose foi detectada nos cultivos catarinenses no final de 2004, a síndrome da mancha branca (WSS). Esta virose representa a mais ameaçadora e devastadora enfermidade de camarões marinhos até então detectada (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008), pois além de atacar vários tecidos do animal, compromete seriamente o sistema imunológico do mesmo, uma vez que uma das principais células-alvo para a sua replicação são os hemócitos granulares (WANG *et al.*, 2002).

O surgimento da WSS em SC abalou de maneira muito importante a carcinicultura no estado, levando à quase extinção da atividade. Somente no último ano é que a atividade foi parcialmente reativada. Embora ambas as viroses mereçam estudos para melhor compreendê-las e combatê-las, a WSS, por ser uma virose mais ameaçadora e estar relacionada aos cultivos do nosso estado, merece esforços concentrados no sentido de desenvolver estudos para auxiliar no seu combate e minimização, visando assim o restabelecimento da carcinicultura catarinense.

Vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

O WSSV foi diagnosticado pela primeira vez em fazendas produtoras de camarão no norte de Taiwan em 1992, causando uma enfermidade que provocou a mortalidade maciça e rápida dos animais (CHOU *et al.*, 1995). A partir de 1993 o vírus passou a ser detectado em vários outros países asiáticos e também na América do Norte, como nos Estados Unidos, em fazendas do Texas e da Carolina do Sul (LIGHTNER, 1996; WANG *et al.*, 1999a) Após 1998, o WSSV se espalhou em cultivos da América Central e do Sul, como a Nicarágua, Guatemala, Honduras, Panamá, México, Colômbia, Peru e Equador, sendo particularmente devastador neste último país (CHAMBERLAIN, 1999). Até 2004, o Brasil era um dos únicos países "livres" de WSSV, ou pelo menos onde a virose não tinha ainda sido detectada. No entanto, em novembro deste ano, fazendas do Complexo Lagunar Sul no município de Imaruí, em Santa Catarina, registraram mortalidades maciças, sendo posteriormente diagnosticado o mesmo agente etiológico (WSSV) em várias outras regiões do estado (S. WINCKLER, comunicação pessoal).

O WSSV possui uma ampla variedade de hospedeiros, dentre eles camarões, lagostas, lagostins, caranguejos e outras espécies, como membros do filo *Chaetognatha* e *Rotifera*, além de poliquetas e algumas larvas aquáticas de insetos (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). No entanto, muitas delas não são necessariamente hospedeiros naturais do WSSV, sendo consideradas apenas vetores. O vírus quando está livre na natureza pode permanecer ativo por 4 a 5 dias, podendo ser disseminado por correntes marinhas e permanecer no ambiente por vários anos (MARQUES, 2008). Camarões em ambiente natural ou de cultivo podem ser portadores assintomáticos do WSSV e apesar do vírus afetar virtualmente várias espécies de crustáceos, seu maior poder de virulência está voltado aos camarões peneídeos. Para exemplificar, *L. vannamei* pode sofrer uma mortalidade de 90 a 100% entre 3 a 7 dias após a infecção viral (ZHAN *et al.*, 1998).

O WSSV foi classificado como sendo o único membro conhecido de um novo gênero de vírus, *Whispovirus*, pertencente a uma nova família, *Nimaviridae* (BONAMI, 2008). Caracteriza-se por ser um vírus envelopado, baciliforme, medindo entre 210-380 nm de comprimento por 70-167 nm de largura, possuindo uma extensão em forma de filamento na extremidade da partícula viral, por vezes observada em microscopia eletrônica (Fig. 3) (ESCOBEDO-BONILLA *et al.*, 2008). O genoma do WSSV é composto por uma molécula de DNA dupla fita, circular e longa, com tamanho variável entre 293 kpb a 307 kpb (van HULTEN *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2002), sendo um dos maiores genomas virais sequenciados até o momento. Além disso, o WSSV infecta especialmente as células de origem ectodermal e mesodermal, incluindo células da epiderme, brânquias, intestino (CHANG *et al.*, 1996), glândula antenal, órgão linfóide (DURAND *et al.*, 1996; CHANG *et al.*, 1998), músculo, coração (KOU *et al.*, 1998), gônadas (LO *et al.*, 1997), células hematopoiéticas, hemócitos e células associadas ao sistema nervoso central (RAJENDRAN *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999b). A doença se manifesta geralmente quando ocorre um desequilíbrio no cultivo decorrente, por exemplo, de altas densidades populacionais, má preparação do solo, baixa qualidade de água, excesso de matéria orgânica no solo e temperaturas entre 25 e 28°C, ideais para a replicação viral (MARQUES, 2008).

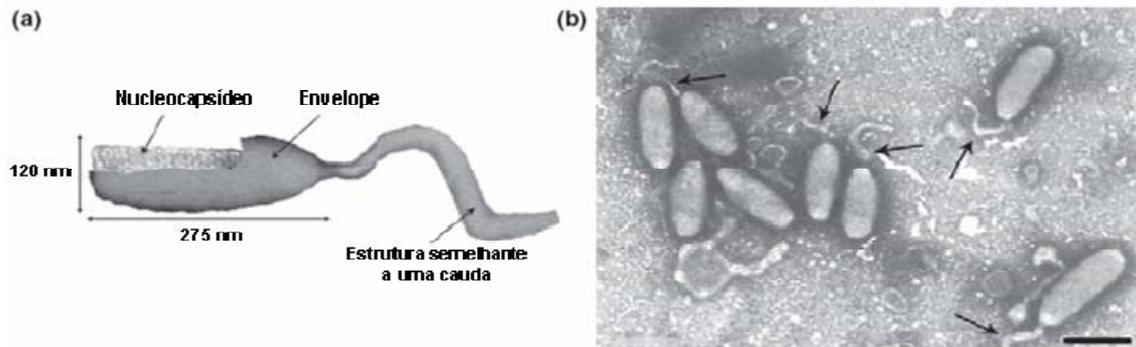


Figura 3: Morfologia do vírion da síndrome da mancha branca (WSSV) (a). Microscopia eletrônica mostrando o virion com uma estrutura semelhante a uma “cauda” (setas pretas) (barra = 250 nm) (b). (Foto adaptada de DURAND *et al.*, 1996).

Em casos severos da enfermidade, os animais podem apresentar pontos brancos no exoesqueleto (origem da denominação “*white spot*”) (LO *et al.*, 1996a), resultante de uma disfunção no tegumento que gera deposição de sais de cálcio na cutícula e formação destes pontos brancos (WANG *et al.*, 1999a). Outros sinais clínicos de uma infecção severa incluem uma coloração avermelhada do corpo e apêndices (LIGHTNER *et al.*, 1998), redução na alimentação dos animais (CHOU *et al.*, 1995; DURAND *et al.*, 1996; FLEGEL *et al.*, 1997), aparecimento de cutícula frouxa (LO *et al.*, 1996b), acúmulo de líquido nas brânquias levando a um inchaço das mesmas (OTTA *et al.*, 1999) e retardo no tempo de coagulação da hemolinfa (WANG *et al.*, 2000).

Histologicamente, a infecção por WSSV é caracterizada por células com núcleo hipertrofiado mostrando inclusões intra-nucleares e cromatina marginal (DURAND *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2000). Os núcleos infectados se apresentam progressivamente mais basofílicos e aumentados (CHANG *et al.*, 1996; DURAND *et al.*, 1996; LO *et al.*, 1996b; FLEGEL *et al.*, 1997) e nos estágios mais avançados da infecção, a cariorexis e uma desintegração celular podem ocorrer o que leva à formação de áreas com necrose e vacuolização (KARUNASAGAR *et al.*, 1997; KASORNCHANDRA *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1999a).

Em relação ao tratamento, métodos convencionais, como o uso de drogas químicas, não apresentam nenhuma eficácia contra esta enfermidade. Por outro lado, a biotecnologia e a biologia molecular têm tido, nos últimos anos, um importante e crescente papel na busca de novos métodos para a detecção de patógenos, na elucidação da patogenicidade e no desenvolvimento de medidas de controle e prevenção mais eficazes. Todavia, toda esta metodologia voltada para o ‘diagnóstico e tratamento’ das enfermidades deve, *a priori*, estar fundamentada no conhecimento prévio dos mecanismos de defesa desencadeados por estes animais frente às viroses.

Considerações sobre o sistema imune dos crustáceos

O sistema imunológico dos animais está dividido em Imunidade Inata ou Natural, e Imunidade Adaptativa ou Adquirida, sendo que ambas apresentam reações humorais e celulares de defesa. No caso dos vertebrados o sistema imune é composto tanto por reações inatas de defesa quanto pelas adaptativas, resultando assim em um sistema complexo onde uma infinidade de receptores e

anticorpos específicos estão presentes, além de células de memória e uma proteção altamente eficiente e específica para a maioria dos patógenos. Esta resposta imune adaptativa está ligada à presença de linfócitos nos quais estão embasados todos os mecanismos de especificidade e de memória imunológica, que tornam viável a produção de vacinas específicas para prevenção de várias infecções (*vide* revisão de BARRACCO *et al.*, 2008).

No caso dos invertebrados, como os crustáceos, eles apresentam apenas a imunidade inata, o que significa que seu organismo não está apto a produzir anticorpos antígeno-específicos e que não possui, portanto, memória imunológica. Em outras palavras, a confecção de vacinas para crustáceos, no termo clássico da palavra, é inviável. Sendo assim, deve-se buscar mecanismos que tornem esses animais imunologicamente mais competentes para enfrentarem de maneira eficaz os patógenos e impedir assim o estabelecimento dos processos infecciosos.

O sistema imune dos crustáceos está ligado à sua hemolinfa ou sangue que é composta por uma fração celular (hemócitos) e uma fração líquida (plasma), onde se encontram dissolvidos os fatores humorais. Os hemócitos são os principais sítios de síntese das moléculas imunológicas (GROSS *et al.*, 2001), sendo responsáveis pelas reações celulares de defesa além de mediar várias reações humorais nestes animais. É importante salientar que as respostas imune-celulares e humorais atuam de uma forma integrada, protegendo os crustáceos contra a invasão de microrganismos e parasitas e garantindo assim sua integridade corpórea e homeostática.

Os principais sistemas de defesa atualmente reconhecidos nos crustáceos são: (1) coagulação da hemolinfa; (2) melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase; (3) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas; (4) sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, RNA de interferência (RNAi) e por proteínas de reconhecimento-padrão (PRPs); (5) produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio; e (6) sistema fagocítico e de encapsulamento (*vide* revisão de IWANAGA e LEE, 2005).

Os crustáceos possuem três diferentes populações de hemócitos: *hemócitos hialinos* (HHs), *hemócitos semi-granulares* ou *com grânulos pequenos* (HGPs) e *hemócitos com grânulos grandes* (HGGs), e apesar das dificuldades para identificá-los e caracterizá-los, o desenvolvimento de soluções anticoagulantes específicas têm atualmente conseguido estabilizar estas células *in vitro*, permitindo uma melhor caracterização dos tipos celulares (*vide* revisão de BARRACCO *et al.*, 2008). Os HH são os menores hemócitos, apresentando uma alta relação núcleo-citoplasma e contendo de nenhum a poucos grânulos em seu citosol, estando aparentemente relacionados ao mecanismo de coagulação da hemolinfa dos crustáceos (HOSE *et al.*, 1990), ou ainda ligados à fagocitose, como acreditam outros autores (JOHANSSON *et al.*, 2000). Por sua vez, os hemócitos granulares (HGPs e HGGs) são descritos como células contendo citoplasma abundante e rico em grânulos de diversos tamanhos e conteúdos, estando especialmente envolvidos na fagocitose de microrganismos, na formação de cápsulas e nódulos, na produção de moléculas citotóxicas e microbicidas e da maioria das proteínas envolvidas, direta ou indiretamente, com o sistema imune destes animais (*vide* revisão de HOSE *et al.*, 1990).

Após a invasão por microrganismos e/ou patógenos oportunistas, os hemócitos migram para os sítios de infecção gerando uma resposta inflamatória. Nesses locais ocorrem reações celulares

como a fagocitose de microrganismos e/ou a formação de agregados celulares densos em torno de partículas invasoras, denominadas de nódulos e cápsulas (*vide* revisão de JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Durante o processo fagocítico, comumente observa-se a interiorização do agente em um fagossomo que se une aos lisossomos e então ocorre a produção e liberação pelos hemócitos de moléculas citotóxicas e/ou líticas, que auxiliam na morte e degradação do agente invasor.

Outro processo importante que ocorre, porém quando a quantidade de microrganismos invasores é maior ou quando os patógenos são de tamanho grande, como hifas de fungos, nematódeos e determinados protozoários, é a formação de nódulos e cápsulas, onde estes patógenos ficam aprisionados nos tecidos e posteriormente são destruídos. A formação de nódulos e cápsulas não só limita as respostas imunológicas à região agredida, como também protege os tecidos do hospedeiro dos danos causados pelas moléculas tóxicas e degradativas produzidas durante o processo inflamatório (*vide* revisão de BARRACCO *et al.*, 2008).

Neste momento, em que ocorre a produção e liberação pelos hemócitos de moléculas citotóxicas e/ou líticas, um importante aumento do consumo intracelular de oxigênio pela enzima NADPH oxidase é observado, em um fenômeno conhecido por *burst* respiratório. Uma série de compostos intermediários de oxigênio, altamente reativos, conhecidos como ROIs (do inglês, *reactive oxygen intermediates*) são então produzidos. Concomitantemente à produção de ROIs, são produzidos os intermediários reativos de nitrogênio (do inglês, RNIs), como o NO e o peroxinitrito (ONOO⁻), compostos também altamente citotóxicos e microbicidas (KRÖNCKE *et al.*, 1997).

Os ROIs são oxidoradicais que possuem elétrons livres e não pareados em sua camada orbital mais externa, o que lhes confere uma elevada reatividade com estruturas e compostos próximos, tais como membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos (DNA), funcionando assim como agentes microbicidas potentes, destruindo ou inibindo o crescimento dos microrganismos invasores (*vide* revisão de ANDERSON, 1996; BOGDAN *et al.*, 2000). A NADPH oxidase está localizada na membrana celular e na superfície dos grânulos lisossomais e é ativada por componentes microbianos como os lipopolissacarídeos (LPS), as lipoproteínas da parede bacteriana e pelas β -glicanas da parede de fungos (BOGDAN *et al.*, 2000). A ativação da NADPH resulta na redução do oxigênio molecular a ânion superóxido (O₂⁻) que pode se dismutar espontaneamente ou através da enzima intracelular superóxido dismutase (SOD), em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual é decomposto pela catalase peroxissomal. O O₂⁻ pode ainda ser convertido a outros componentes citotóxicos, tais como no radical hidroxila ([•]OH) e ânions hidroxila (OH⁻) pela reação de Haber-Weiss ou, após dismutação em H₂O₂, ácido hipocloroso (HOCl), oxigênio singlet (¹O₂) e em cloraminas pela ação da mieloperoxidase (MOP) (BOGDAN *et al.*, 2000).

No entanto, não somente os agentes patogênicos podem sofrer a ação destes componentes altamente tóxicos, mas os tecidos do próprio hospedeiro também, podendo ser estes seriamente danificados. Como mecanismo de proteção, o hospedeiro conta com uma gama de enzimas celulares antioxidantes (SOD, catalase e glutathione peroxidase) e também de enzimas de reparo de DNA e membranas que podem interagir diretamente com os radicais livres, neutralizando-os (WARNER, 1994). Além disso, compostos exógenos podem chegar via alimentação e atuarem como agentes

antioxidantes, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutatona e o α -tocoferol (vitamina E) (WARNER, 1994).

Dentre os fatores humorais encontrados nos crustáceos estão as proteínas de reconhecimento padrão (PRPs, do inglês, *pattern recognition proteins*), que reconhecem padrões moleculares especificamente expressos em patógenos (PAMPs, do inglês, *pathogen associated molecular patterns*), como os LPS presentes na parede de bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) presentes em bactérias Gram-positivas e as β -glicanas da parede de fungos. Dentre as PRPs atualmente reconhecidas em crustáceos estão: a proteína que se liga aos LPS (LBP), proteínas que se ligam a β -1,3-glicanas (BGBP e GBP), proteína que se liga a ambos, LPS e β -1,3-glicanas (LGBP), proteína *masquerade-like* (*mas-like*), além de várias classes de lectinas (*vide* revisão de LEE e SÖDERHÄLL, 2002).

A formação de nódulos e cápsulas hemocíticas em crustáceos é frequentemente acompanhada por uma reação central de melanização (SÖDERHÄLL e CERENIUS, 1998), sendo este processo também observado durante a cicatrização de ferimentos. A biossíntese de melanina nos artrópodes é resultante da ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema é composto por vários zimógenos de proteases, pela proPO, além das PRPs e moléculas associadas, sendo reconhecido como um importante mecanismo de reconhecimento do não-próprio, uma vez que seja ativado por componentes da superfície de microrganismos, tais como os LPS e as β -1,3-glicanas (*vide* revisão CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004).

Durante as infecções, estes compostos se ligam a receptores dos hemócitos granulares diretamente ou através de PRPs plasmáticas e induzem uma degranulação ou exocitose regulada, com liberação de várias moléculas imunoefetoras, entre as quais as moléculas do sistema proPO. Uma vez liberadas, ocorre a ativação deste sistema pelos próprios componentes dos microrganismos presentes na hemocele do animal.

A enzima chave que desencadeia este processo é a fenoloxidase (PO) estocada nos grânulos hemocitários sob a forma zimogênica proPO. A ativação da proPO é mediada por uma serino-protease, também confinada nos grânulos e que é concomitantemente liberada à proPO, no momento em que a célula é ativada pelo microrganismo. Uma vez no citosol, a serino-protease é ativada por um mecanismo ainda não muito bem compreendido, ativando em seguida a proPO em PO e iniciando assim, a cascata proteolítica que culminará na formação da melanina (*vide* revisão CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004).

Em relação ao papel imunológico do sistema proPO, sabe-se que esta via gera transitoriamente moléculas altamente tóxicas, como as quinonas, hemiquinonas e radicais livres, que apresentam atividade citotóxica contra os patógenos invasores (NAPPI e OTTAVIANI, 2000). A melanina, *per se*, não é a molécula mais importante durante o processo, sendo sim os compostos citotóxicos intermediários e os radicais livres produzidos, os verdadeiros imunoefetores (NAPPI e VASS, 1993). No entanto, a melanina parece ter uma atividade fungistática (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004), podendo ainda funcionar como *scavenger* de radicais livres (NAPPI e VASS, 1993; NAPPI e OTTAVIANI, 2000), minimizando os efeitos deletérios destas moléculas altamente tóxicas para o organismo do hospedeiro. Sendo assim, a melanização representa, mais

especificamente, o final de um potente processo imunoefetor desencadeado nos crustáceos. A ativação deste sistema deve ser estritamente regulada para evitar uma ativação indesejada ou generalizada no organismo do crustáceo. Para isso, os animais possuem inibidores de proteases dissolvidos no plasma, como a pacifastina, (LIANG *et al.*, 1997), os inibidores da família *Kazal* (JOHANSSON *et al.*, 1994; JIMÉNEZ-VEGA e VARGAS-ALBORES, 2005; SOMPRASONG *et al.*, 2006), a serpina (LIANG e SÖDERHÄLL, 1995) e a $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2M$) (HERGENHAHN *et al.*, 1988). A $\alpha 2M$ é uma glicoproteína plasmática constitutivamente sintetizada pelos hemócitos dos crustáceos (GROSS *et al.*, 2001; RATTANACHAI *et al.*, 2004) e atua como um inibidor de proteases de amplo espectro (serino, aspartato, cisteína e metalo-proteases). Desta forma, esta proteína inibe virtualmente tanto as proteases endógenas do hospedeiro, regulando a superativação de sistemas proteolíticos, como também inibe proteases exógenas, eventualmente produzidas pelo patógeno durante o processo infeccioso (*vide* revisão de ARMSTRONG, 2006).

O papel imunomodulador da $\alpha 2M$ nos crustáceos ainda não está bem estabelecido, no entanto, sabe-se que ela regula fracamente a ativação do sistema proPO no lagostim *Pacifastacus leniusculus* (HERGENHAHN *et al.*, 1988; ASPÁN *et al.*, 1990) e inibe proteases produzidas pelo fungo *Aphanomyces spp*, um patógeno conhecido para lagostins de água doce (DIEGUEZ-URIBEONDO e CERENIUS, 1998). Além disso, análises recentes da expressão gênica da $\alpha 2M$ em tempo real em *P. monodon* revelaram que sua expressão é aumentada nas primeiras 48h de infecção com WSSV (TONGANUNT *et al.*, 2005) ou após tratamento dos animais com LPS (VASEEHARAN *et al.*, 2007) ou PGs bacterianos (LIN *et al.*, 2007; 2008). Estes achados conjuntos sugerem fortemente, portanto, que a $\alpha 2M$ participe direta ou indiretamente das respostas imunológicas dos camarões.

Outras moléculas de reconhecimento padrão encontradas em invertebrados são as lectinas e/ou aglutininas que são proteínas, sem atividade catalítica, com capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos da superfície de diferentes células, incluindo microrganismos, causando a sua aglutinação. Esta propriedade deriva do fato destas moléculas serem ao menos bivalentes, apresentando dois ou mais sítios de ligação (*vide* revisão de MARQUES e BARRACCO, 2000). Devido ao fato das lectinas serem capazes de reconhecer e se ligar a açúcares específicos da superfície de patógenos, tanto de vertebrados como de invertebrados, estas moléculas são também definidas como PRPs, além estarem envolvidas em vários processos biológicos, devido à sua interação com carboidratos, como a adesão celular, a opsonização e a formação de nódulos (*vide* revisão de LEE e SÖDERHÄLL, 2002).

Além dos processos e moléculas acima descritos, os crustáceos apresentam ainda mecanismos antivirais. A imunidade antiviral dos crustáceos só muito recentemente vem sendo estudada e compreendida, porém ainda faltam informações acerca de todos os mecanismos envolvidos (*vide* revisão de LIU *et al.*, 2009). No entanto, espera-se para os próximos anos um grande avanço neste campo de estudo dado à grande necessidade de se compreender como estes animais respondem imunologicamente às infecções virais, tão ameaçadoras para os cultivos. Dentre as respostas antivirais reconhecidas atualmente nos crustáceos estão a apoptose, o sistema de RNA de interferência (RNAi) e um mecanismo semelhante ao sistema interferon (IFN) dos vertebrados (*vide* revisões de ROBALINO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009).

A apoptose é um processo fisiológico controlado geneticamente e que está envolvido na regulação da homeostase, no desenvolvimento de tecidos, bem como do sistema imunológico, através da eliminação de células que não são mais úteis. Este processo também atua na eliminação de células infectadas por vírus onde o objetivo é limitar ou inibir a replicação viral, impedindo assim a disseminação do patógeno pelo organismo. A célula infectada se “suicida” silenciosamente, de maneira que não haja lise celular ou uma inflamação descontrolada, como no caso de uma necrose (*vide* revisão de ROULSTON *et al.*, 1999). Uma célula apoptótica apresenta várias alterações morfológicas e bioquímicas, tais como a ativação de enzimas nucleares e proteases (caspases), condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, lobulação da membrana, encolhimento celular, e, por fim, uma fragmentação da célula em pequenas vesículas revestidas por membrana (corpos apoptóticos), que, em geral, são rapidamente fagocitadas pelas células vizinhas e/ou macrófagos.

No caso de uma infecção viral, a apoptose se mostra efetiva quando for induzida em um estágio inicial do processo infeccioso. Entretanto, alguns vírus conseguem retardar o processo apoptótico, matando as células apenas no final do ciclo (*vide* revisão de ROULSTON *et al.*, 1999), o que é altamente indesejável para o hospedeiro e extremamente favorável ao vírus. Neste caso, os vírus empacotados em corpos apoptóticos não são detectados pelo sistema imune, evitando assim as respostas inflamatórias e a sua inativação por anticorpos e proteases do hospedeiro. Estes corpos contendo inúmeras cópias virais são então fagocitados pelas células vizinhas, que ironicamente garantem a propagação e a infecção viral por estas outras células. Ou seja, a indução de uma apoptose tardia parece ser uma ótima estratégia de propagação para os vírus que evolutivamente não desenvolveram ainda defesas anti-apoptóticas ou outros mecanismos de evasão imunológica (*vide* revisão de ROULSTON *et al.*, 1999).

Em camarões, a indução de apoptose por infecções virais vem sendo ativamente descritas nestes últimos anos. Em *P. monodon* infectados pelo WSSV (SAHTOUT *et al.*, 2001; WONGPRASERT *et al.*, 2003) ou pelo YHV (KHANOBDEE *et al.*, 2002) ocorre um aumento progressivo de apoptose até níveis muito altos, comprometendo assim vários tecidos e parecendo ser a principal causa da morte dos camarões. Aparentemente, nas infecções virais severas de camarões, ocorre uma indução tardia da apoptose, que leva a uma forte propagação da progênie viral e resulta na morte do camarão por excesso de apoptose em seus tecidos.

Componentes virais tais como DNA e RNA genômicos e RNA dupla fita (dsRNA) gerados nas células infectadas podem ser detectados por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do hospedeiro, no caso de vertebrados (KAWAI e AKIRA, 2006). Após este reconhecimento, as PRRs acionam respostas antivirais efetivas que incluem a produção de várias citocinas, como os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β) e a indução de reações inflamatórias e imunoadaptativas (KAWAI e AKIRA, 2006). Os interferons (IFNs) são proteínas que *interferem* na replicação viral e induzem um estado antiviral inespecífico no hospedeiro. No caso dos IFN- α/β dos vertebrados, estas citocinas desencadeiam a ativação de múltiplas vias intracelulares que interferem no ciclo viral, limitando a replicação e a amplificação do processo infeccioso (GUIDOTTI e CHISARI, 2001).

Nos invertebrados, mais especificamente nos crustáceos, nenhuma molécula ou gene com homologia estrutural aos IFNs de mamíferos foi até o momento encontrada (ROSA e BARRACCO, 2008). Apesar disso, existe na literatura vários relatos recentes que indicam a presença nestes animais de moléculas associadas a uma defesa antiviral inespecífica, possivelmente semelhante ao sistema interferon dos mamíferos (*vide* revisões ROBALINO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2009). A primeira vez que um estado antiviral inespecífico foi demonstrado em invertebrados foi em 2004 por Robalino *et al.* (2004) em camarões *L. vannamei*. Os animais tinham sido injetados com um dsRNA de sequência inespecífica e foi observado um aumento significativo na sua resistência contra infecções posteriores por dois outros vírus, não relacionados, o TSV e o WSSV (ROBALINO *et al.*, 2004), ou seja, muito semelhante ao estado antiviral induzido pelos IFNs dos mamíferos. Frente a este resultado, supõe-se que citocinas análogas, porém não homólogas aos IFNs de vertebrados devam existir em camarões e seriam as responsáveis pela produção do estado antiviral inespecífico relatado no trabalho acima.

Além de induzir o sistema IFN em vertebrados, o padrão molecular dsRNA viral é também capaz de desencadear múltiplas outras vias intracelulares que também levam a outras respostas antivirais. Dentre elas, destaca-se o mecanismo de silenciamento pós-transcricional de genes, conhecido por RNA de interferência ou RNAi (HANNON *et al.*, 2002, ROBALINO *et al.*, 2007). Neste processo o dsRNA desencadeia a destruição de RNAm homólogos à sua sequência. Ou seja, diferentemente do sistema IFN que é induzido inespecificamente por qualquer sequência de dsRNA, a proteção antiviral baseada na via RNAi é sequência-específica. A técnica de RNAi tem sido abordada como uma alternativa para neutralizar infecções causadas por vírus de camarões em *L. vannamei*. Robalino *et al.* (2005) mostraram a ocorrência de uma proteção antiviral praticamente completa contra infecções por WSSV e por TSV, mediante a injeção de sequências específicas de dsRNA para ambos os tipos de vírus. De forma semelhante, sequências específicas de dsRNA foram também capazes de suprimir a replicação do vírus YHV em *P. monodon* (YODMUANG *et al.*, 2006), assim como também em cultura de células destes animais (TIRASOPHON *et al.*, 2005).

Para monitorar a saúde e o *status* imunológico dos camarões, várias das moléculas imunológicas anteriormente descritas podem ser utilizadas como parâmetros hemato-imunológicos. Dentre os mais comumente utilizados estão a atividade da PO, a capacidade aglutinante da hemolinfa, a produção intracelular de ânions superóxido, a concentração protéica da hemolinfa e a contagem total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH) (*vide* revisão de BARRACCO *et al.*, 2008). Estes imunoparâmetros podem representar ferramentas valiosas para avaliar as condições de imunocompetência de animais submetidos a diferentes condições, tais como, infecções microbianas e parasitárias, alterações ambientais e tratamentos com substâncias imunoestimulantes.

Substâncias imunoestimulantes: polissacarídeos sulfatados (PS)

Como dito anteriormente, o surgimento de enfermidades nos cultivos, principalmente as de origem viral, tem se tornado um grande obstáculo ao sucesso da carcinicultura. No momento, a profilaxia e o controle de doenças nos cultivos estão basicamente restritos às boas práticas de

manejo e à redução nas condições de estresse, uma vez que os fatores que determinam o estado de saúde dos camarões são ainda muito pouco conhecidos. Neste sentido, muitas substâncias vêm sendo estudadas e testadas para averiguar se possuem um efeito imunestimulante sobre os animais. Em caso positivo, a sua utilização poderia minimizar o efeito destas enfermidades, seja aumentando a resistência natural dos animais, seja diminuindo ou eliminando o uso de outros agentes químicos terapêuticos, como os antibióticos, que além de contaminarem a carne do animal e o ambiente, ainda induzem o aparecimento de microrganismos resistentes.

Substâncias ditas “imunestimulantes” podem ser obtidas a partir de várias origens naturais e também por síntese química, com base na estrutura molecular dos próprios produtos naturais. Dentre estes compostos, muitos são derivados de microrganismos ou de algas, destacando-se os componentes da parede celular de diferentes bactérias, fungos, micro e macroalgas. Alguns dos principais compostos ativos descritos na literatura como sendo capazes de gerar uma imunestimulação em camarões são os carboidratos: polissacarídeos sulfatados (PS), β -glicanas, lipopolissacarídeos (LPS), e peptidoglicanas (PGs) (SMITH *et al.*, 2003).

Estas substâncias, se eficazes, apresentam uma série de vantagens em relação aos antibióticos tradicionais tais como, ausência de toxicidade ou residualidade, não promovem resistência, tem baixo custo e não ocasionam impactos negativos ao meio ambiente (BERGER, 2000). No caso dos camarões a administração experimental destes compostos é efetuada através de injeção, imersão ou como complemento alimentar adicionado à ração. Este último é considerado mais adequado, pois além de facilitar a administração, pode ser ministrado para uma quantidade maior de indivíduos ao mesmo tempo, e não causa estresse aos animais (SMITH *et al.*, 2003).

Os PS são compostos largamente distribuídos entre os seres vivos, ocorrendo no tecido conjuntivo dos vertebrados (MATHEWS, 1975) e em menor quantidade nos invertebrados (CÁSSARO e DIETRICH, 1977), sendo ainda encontrados em grandes quantidades nas algas marinhas, principalmente nas macroalgas e em gramíneas marinhas (PAINTER, 1983; AQUINO *et al.*, 2005). Quimicamente os PS são macromoléculas carregadas negativamente, atóxicas e que possuem propriedades gelatinizantes e espessantes (RODRIGUES, 2006), encontrados especialmente na parede celular das algas marinhas, onde está presente tanto nos componentes fibrilares, quanto nos amorfos (PAINTER, 1983). Nas macroalgas, os PS são encontrados na forma de fucoidanas nas algas pardas (*Phaeophyceae*), galactanas nas algas vermelhas (*Rhodophyceae*) e arabinogalactanas nas algas verdes (*Chlorophyceae*) (PERCIVAL e McDOWELL, 1967).

As galactanas das algas vermelhas são polissacarídeos lineares com unidades alternantes de ligações no resíduo 3- β -galactopiranosil ou 4- α -galactopiranosil, divididas em três classes: carragenanas, agaranas e híbridos de DL-galactanas (Fig. 4) (DAMONTE *et al.*, 2004). Além da galactose e sulfato, outros resíduos de carboidratos como xilose, glicose, ácidos urônicos podem estar presentes em baixas quantidades nas carragenanas (van de VELDE *et al.*, 2004).

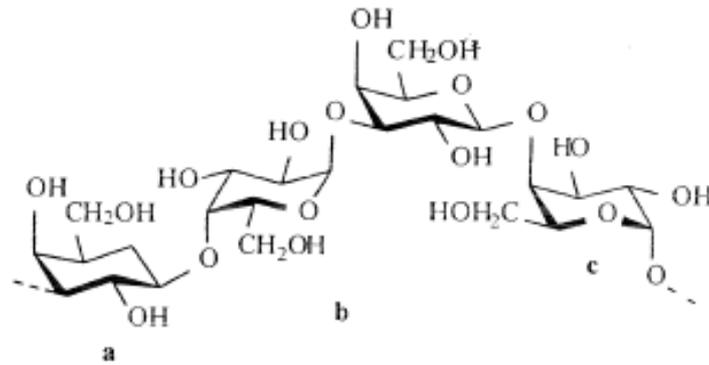


Fig. 4: Híbridos de DL-galactana. (a) Domínio carragenana; (b) Zona de junção; (c) Domínio da agarana (DAMONTE *et al.*, 2004).

Dentre as macroalgas vermelhas de interesse econômico destacam-se as do gênero *Gracilaria* por ser a principal fonte de matéria-prima para a produção mundial de ágar (OLIVEIRA e ALVEAL, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2000), um ficolóide importante para as indústrias farmacêutica e alimentar (CARTÉ, 1996). Até o momento, mais de 100 espécies já foram descritas, e sua distribuição está especialmente localizada nos mares tropicais e temperados de todo o mundo (OLIVEIRA e PLASTINO, 1994). A espécie *Gracilaria birdiae* (Fig. 5) é encontrada na costa litorânea do Nordeste brasileiro, cuja distribuição se estende do litoral cearanense até o Espírito Santo, sendo frequentemente coletada em bancos naturais para a indústria de extração de ágar (PLASTINO e OLIVEIRA, 2002).



Figura 5: Exemplar da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* (Fonte: <http://peixes.brasilmergulho.com.br/thumbnails.php>).

Em relação às atividades biológicas dos PS de algas investigadas em vertebrados destacam-se as atividades antiinflamatórias, próinflamatórias, antitumoral, antimetastática, antiproliferativa, antiviral, anticoagulante e antitrombótica (veja revisão de BOISSON-VIDAL *et al.*, 1995) sendo as três últimas as mais estudadas. As atividades antivirais dos PS de algas vermelhas e pardas vêm sendo estudadas *in vitro* (células de vertebrados) e resultados promissores foram descritos contra uma

grande variedade de vírus envelopados, incluindo os herpes vírus simples tipos 1 e 2 (HSV), citomegalovírus humano (CMV), vírus sincicial respiratório, vírus da estomatite vesicular, vírus Sindbis (SINV), vírus da dengue e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BABA *et al.*, 1988; WITVROUW e DE CLERCQ, 1997; MAZUMBER *et al.*, 2002; DAMONTE *et al.*, 2004; CHATTOPADHYAY *et al.*, 2008; HIDARI *et al.*, 2008). Em contrapartida, os vírus não envelopados parecem não ser significativamente sensíveis a estes compostos (DAMONTE *et al.*, 2004). Foi demonstrado ainda, que os PS de algas podem ser utilizados como auxiliares em terapias e na profilaxia contra infecções retrovirais e oportunistas em pacientes com o HIV (WITVROUW e DE CLERCQ, 1997).

Estudos *in vitro* com células de mamíferos demonstraram que a atividade antiviral de alguns PS de algas está associada à capacidade destes compostos em impedir fisicamente a entrada do vírus na célula hospedeira, e, por conseguinte, desenvolver uma infecção (WITVROUW e DE CLERCQ, 1997; DAMONTE *et al.*, 2004). O contato inicial do vírus envelopado com a célula-alvo ocorre por interação iônica entre regiões positivamente carregadas das glicoproteínas presentes no envelope viral e os constituintes negativamente carregados da membrana da célula-alvo. Uma vez que os PS apresentam regiões altamente sulfatadas, portanto carregadas negativamente, quando em contato com o vírus, estes compostos interagem fisicamente com os domínios positivos das glicoproteínas virais, bloqueando o acesso do vírion à membrana celular e, portanto, impedindo sua ligação e entrada na célula-alvo (vide revisão de DAMONTE *et al.*, 2004). Vale ressaltar que o aumento da atividade antiviral dos PS é diretamente proporcional ao seu peso molecular e grau de sulfatação (WITVROUW *et al.*, 1997).

Em camarões, existem alguns relatos sobre uma possível ação imunoestimulante de alguns PS, porém faltam ainda estudos que comprovem estes efeitos ou que expliquem quais os mecanismos efetivos de sua ação. Estudos realizados com várias espécies de camarões, entre elas, *L. vannamei* (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002; HOU e CHEN, 2005; YEH *et al.*, 2006; FU *et al.*, 2007), *P. monodon* (CHOTIGEAT *et al.*, 2004) e *F. chinensis* (HUANG *et al.*, 2006), tratados com PS e extratos de algas marinhas através da alimentação, banhos de imersão ou injeção, tem demonstrado uma ativação de alguns parâmetros do sistema imune, além do aumento na resistência a víbrios ou redução no impacto causado pelo WSSV.

A utilização de substâncias imunoestimulantes, como os PS de algas marinhas, com o intuito de atingir um estado de maior imunocompetência em crustáceos de interesse econômico, desponta então como uma alternativa de grande utilidade, uma vez que estes animais não podem ser vacinados. No entanto, existe uma falta quase completa de informação sobre o mecanismo de ação destes compostos sobre o sistema imune de camarões, além de não haver consenso sobre sua real eficácia, uma vez que nem sempre se verifica uma reprodutibilidade nos resultados.

O artigo será submetido para publicação na revista *Aquaculture* e está formatado de acordo com as normas da mesma.

Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos polissacarídeos sulfatados extraídos da macroalga *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), através da análise de diferentes parâmetros hemato-imunológicos.

Objetivos específicos

- Preparar uma ração comercial para camarões suplementada com PS extraídos da macroalga *G. birdiae*;
- Determinar a melhor concentração destes PS na ração capaz de induzir um aumento na imunocompetência de juvenis *L. vannamei*;
- Avaliar a imunocompetência de *L. vannamei* alimentados com ração acrescida com PS e infectados experimentalmente com baixas doses de WSSV, em diferentes períodos da infecção;
- Determinar o hemograma dos animais através das contagens total (CTH) e diferencial de hemócitos (CDH);
- Quantificar a produção intracelular de ânions superóxido (O_2^-) pelos hemócitos imunoestimulados *in vitro* por laminarina (β -1,3-glicanas) ou LPS;
- Determinar as atividades da fenoloxidase (PO) e do inibidor de proteases α -2 macroglobulina (α 2M) na hemolinfa total e plasma, respectivamente;
- Determinar a capacidade aglutinante, através da titulação de aglutininas/lectinas no soro;
- Determinar a concentração de proteínas totais da hemolinfa;

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DA MACROALGA *Gracilaria birdiae* SOBRE AS CONDIÇÕES DE IMUNOCOMPETÊNCIA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* INFECTADOS COM O VÍRUS DA SÍNDROME DA MANCHA BRANCA (WSSV)

Liege Cantelli^a, Mirian Kaiser^a, Cristhiane Guertler^a, Mauricio Lehmann^b, Wladimir R. L. Farias^c, Margherita A. Barracco^a, Luciane M. Perazzolo^{a*}

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

^bColégio Agrícola Senador Carlos Gomes de Oliveira, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, 89245-000, Brasil

^cLaboratório de Bioquímica Marinha, Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, CE, 60356-000, Brasil

(*) As correspondências devem ser endereçadas para:

e-mail: luciane@ccb.ufsc.br

Fone: 00 55 48 3721 5528

Fax: 00 55 48 3721 5148

Resumo

O efeito dos polissacarídeos sulfatados (PS), extraídos da macroalga *Gracilaria birdiae*, foi testado sobre a imunocompetência do camarão *Litopenaeus vannamei* através da alimentação dos animais com ração contendo 0,3% de PS, seguido por desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) (0,35 DL₅₀). A hemolinfa foi coletada nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com WSSV e utilizada para avaliar alguns parâmetros hemato-imunológicos. Os resultados sugerem uma aparente estimulação da atividade da fenoloxidase e da capacidade aglutinante no dia 14 pós-infecção. O número total de hemócitos (CTH) diminuiu (40%) nos camarões alimentados com a dieta controle (sem PS), mas manteve-se estável nos animais tratados com PS. A porcentagem de hemócitos granulares diminuiu (30%) em todos os grupos desafiados, independentemente da presença de PS. Esses resultados sugerem uma estimulação na produção de hemócitos hialinos associada ao tratamento com PS, uma vez que a CTH não foi alterada. Além disso, verificou-se um aumento na atividade da α 2-macroglobulina e na produção de ânion superóxido em todos os camarões infectados (dias 3 e 14) independente do tratamento com PS. Embora a dieta contendo PS não tenha resultado em imunoestimulação importante nos camarões, os animais desafiados com WSSV apresentaram uma diminuição (11%) na mortalidade quando tratados com PS, em comparação aos da dieta controle. Curiosamente, o vírus não foi detectado nos animais desafiados com WSSV a partir do dia 3. Acredita-se que esse achado esteja relacionado ao fenômeno de interferência viral, já que os animais apresentaram-se infectados de forma latente pelo vírus da necrose hipodérmica e hematopoiética (IHHNV). Estudos futuros devem ser realizados para esclarecer tal fenômeno, bem como a atuação dos PS de *G. birdiae* na sobrevivência dos animais.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, sistema imune de crustáceos, imunoestimulantes, polissacarídeos sulfatados, WSSV.

Abstract

In this study, we analyzed the effect of sulfated polysaccharides (SP), extracted from the macroalgae *Gracilaria birdiae*, on the immunocompetence of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. The animals were fed a diet containing 0.3% SP, prior to a challenge with the white spot syndrome virus (WSSV) (0.35 LD₅₀). Shrimp hemolymph was collected after 0, 3 and 14 days from viral inoculum and was used to evaluate some hemato-immunological parameters. The results indicated that phenoloxidase and hemmagglutinating activities were apparently immunostimulated after 14 days of viral challenge. Moreover, the total number of circulating hemocytes (THC) dropped drastically (40%) in shrimp fed control diet (deprived of SP), but remained unaltered in animals fed SP-diet. The percentage of granular hemocytes decreased considerably (30%) in all challenged shrimp groups, regardless the presence of SP in diet. Therefore, these results suggested an increase of hyaline hemocytes in SP-diet treated shrimp, since their THC did not decline. The results also showed that an elevation of α 2-macroglobulin activity and of anion superoxide production occurred in all infected shrimp (on days 3 and 14) regardless the presence of algal extract in the diet. Although SP-diet did not result in much shrimp immunostimulation, animals challenged with WSSV showed a slight decrease (11%) on their mortality rate. Curiously, WSSV-DNA was not found in infected shrimp. We hypothesized that this result was due to a viral-interference phenomenon, since the animals were found to be positive to the hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV). Future studies are necessary to better elucidate this phenomenon, as well as the effect of SP from *G. birdiae* on shrimp survival.

Key words: *Litopenaeus vannamei*, crustacean immune system, immunostimulants, sulfated polysaccharides, WSSV

1. Introdução

A carcinicultura mundial vem atualmente enfrentando sérios desafios relacionados especialmente a agentes infecciosos como as viroses, em especial a causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). O WSSV é altamente patogênico sendo responsável por importantes prejuízos econômicos à indústria camaroneira mundial (Chang et al., 1998). O WSSV é um vírus de DNA, envelopado pertencente à família *Nimaviridae*, capaz de provocar uma mortalidade de 90 a 100% nos camarões cultivados dentro de 3-7 dias após infecção (Zhan et al., 1998), e com capacidade de infectar uma ampla variedade de hospedeiros.

Os crustáceos possuem apenas um sistema imune inato, capaz de discriminar entre o “próprio” e o “não-próprio”, porém desprovido da imensa variedade de anticorpos específicos e células de memória, como ocorre nos vertebrados. A falta de um sistema imune adaptativo resulta na impossibilidade de se desenvolver vacinas para os crustáceos, diminuindo assim, de forma substancial os meios de prevenção e controle de infecções nesses animais. As respostas imunológicas em crustáceos envolvem a participação direta dos hemócitos (reações celulares), assim como, de várias moléculas dissolvidas no plasma (reações humorais). Sendo assim, respostas imunes celulares e humorais atuam em sinergismo para proteger os animais de invasões e infecções microbianas e parasitárias. As células imunocompetentes ou hemócitos são os principais sítios de síntese das moléculas imunológicas dos camarões (Gross et al., 2001), estando diretamente envolvidos com a fagocitose, a formação de nódulos e cápsulas, e a produção/liberação de moléculas citotóxicas e líticas capazes de degradar e eliminar os agentes invasores (Millar e Ratcliffe, 1994). Nos decápodos os hemócitos são normalmente divididos em três tipos celulares, os hemócitos hialinos (HH), hemócitos com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos com grânulos grandes (HGG) (Hose et al., 1990).

A formação de nódulos e cápsulas hemocíticas é frequentemente acompanhada por uma reação central de melanização (Söderhäll e Cerenius, 1998), decorrente da ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO). Este sistema é composto por vários zimógenos de proteases, pela proPO, além das proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) e moléculas associadas, sendo um importante mecanismo de reconhecimento do não-próprio, pois é ativado por componentes da superfície de microrganismos, como os lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas e as β -1,3-glicanas de fungos (Cerenius e Söderhäll, 2004). A ativação da enzima inativa (proPO) para sua forma ativa fenoloxidase (PO) ocorre pela ação de serino-proteases, as quais iniciam uma cascata proteolítica cujo produto final é a melanina (Aspán e Söderhäll, 1991). No entanto, a ativação deste sistema deve ser estritamente regulada para evitar uma ativação indesejada ou generalizada no organismo do crustáceo. Para isso, os animais possuem inibidores de proteases no plasma e/ou hemócitos como a pacifastina, os inibidores da família *Kazal*, a serpina e a α 2-macroglobulina (α 2M). A α 2M é um inibidor de proteases de amplo espectro (serino, aspartato, cisteína e metalo-proteases), constitutivamente sintetizada pelos hemócitos dos crustáceos, sendo capaz de inibir tanto proteases endógenas do hospedeiro, como aquelas produzidas pelo patógeno durante o processo infeccioso (*vide* revisão Armstrong, 2006).

Os processos fagocíticos são usualmente acompanhados por um importante consumo intracelular de oxigênio pela enzima NADPH oxidase, em um fenômeno conhecido por *burst* respiratório. A NADPH oxidase está localizada na membrana celular e na superfície dos grânulos lisossomais e é ativada por componentes microbianos como os LPS, as lipoproteínas da parede bacteriana e pelas β -glicanas da parede de fungos (Bogdan et al., 2000). A ativação desta enzima gera uma série de moléculas antimicrobianas altamente tóxicas, conhecidas por intermediários reativos de oxigênio (ROIs), que são capazes de destruir os patógenos invasores

Dentre os fatores humorais encontrados nos crustáceos estão as proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) que reconhecem padrões moleculares especificamente expressos em patógenos (PAMPs), como os LPS de bactérias Gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) de bactérias Gram-positivas e as β -glicanas da parede de fungos. Dentre as PRPs de crustáceos estão várias classes de aglutininas e/ou lectinas que são proteínas, sem atividade catalítica, com capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos da superfície de diferentes células, incluindo microrganismos, causando a sua aglutinação e opsonização (Marques e Barracco, 2000).

Em relação à imunidade antiviral em crustáceos só muito recentemente é que se vem compreendendo, embora de maneira ainda limitada, os mecanismos desencadeados por estes animais frente a uma infecção viral. As respostas antivirais reconhecidas atualmente nos crustáceos (Liu et al., 2009) são: (1) apoptose, onde a célula infectada se “suicida”, limitando assim a replicação viral e a expansão da infecção pelo organismo do hospedeiro (*vide* revisão de Roulston *et al.*, 1999); (2) sistema de RNA de interferência (RNAi), que gera um silenciamento pós-transcricional dos genes virais, após a sua indução por sequências de dsRNA virais específicas, reduzindo drasticamente a infecção e gerando uma proteção antiviral específica nos animais (Robalino et al., 2007); e (3) o mecanismo antiviral *inespecífico* decorrente do contato com um dsRNA de sequência inespecífica, gera um aumento na resistência contra infecções posteriores por vírus não relacionados, gerando uma proteção antiviral inespecífica semelhante ao observado no sistema interferon (IFN) dos mamíferos (*vide* revisões de Robalino et al., 2007).

Apesar de todo arsenal imunológico que compõe o sistema imune dos camarões, estes animais estão sujeitos às enfermidades nos cultivos, sendo assim, a busca por substâncias que melhorem a imunocompetência destes camarões desponta como uma alternativa interessante, uma vez que estes não podem ser vacinados. Dentre estas substâncias potencialmente imunoestimulantes para camarões estão descritas as β -glicanas, os LPS, os PGs e os polissacarídeos sulfatados (PS) de algas (Song e Huang, 2000). Na literatura existem alguns relatos sobre a ação estimulante de PS de diferentes algas sobre a imunidade de camarões cultivados, levando ainda a um aumento na resistência às vibrioses (Hou e Chen, 2005; Huang et al., 2006; Yeh et al., 2006; Fu et al., 2007) e a uma redução na mortalidade dos animais pelo WSSV (Chotigeat et al., 2004). O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de um extrato bruto de PS da macroalga vermelha *Gracilaria birdiae* sobre as condições de imunocompetência de *L. vannamei* infectados experimentalmente com baixa carga de WSSV, através da análise de diferentes parâmetros hemato-imunológicos.

2. Materiais e Métodos

2.1. Preparo da ração suplementada com polissacarídeos sulfatados extraídos de *Gracilaria birdiae* (PS) e determinação da melhor concentração de PS na ração

Os PS utilizados neste estudo foram extraídos da macroalga, segundo o protocolo descrito por Lima (2007). Quatro diferentes concentrações de PS (0,1%, 0,3%, 0,6% ou 1,2%) foram adicionadas na ração comercial, triturada e acrescida de 5% aglutinante CMC (carboxi metil celulose). Os PS foram dissolvidos em água aquecida (40°C) e adicionados à ração. A ração sem PS (0%) sofreu o mesmo processo, porém adicionando-se apenas o diluente dos PS. A mistura foi repetizada, seca *overnight* a 45°C, e deixada esfriar lentamente. Para determinar a melhor concentração imunoestimulante de PS na ração, analisou-se 120 *Litopenaeus vannamei* juvenis (10-12 g) aparentemente saudáveis e em período de intermuda provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (UFSC) e acondicionados em caixas de 40 L no Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura (LIAA), onde foram separados em cinco grupos (G1 a G5), com duas réplicas cada (n=24/grupo). Após 48h de aclimação, os camarões foram alimentados por 15 dias (uma vez ao dia) com uma das rações: **G1**: 0% PS; **G2**: 0,1% PS; **G3**: 0,3% PS; **G4**: 0,6% PS e **G5**: 1,2% PS. O consumo alimentar (g de ração/g peso vivo/dia) foi determinado em 0,0040 g/g de peso vivo/dia. No dia 8 e 15 após o início da alimentação, os animais foram amostrados (item 2.3.) e vários parâmetros hemato-imunológicos analisados (itens 2.3.1. a 2.3.6). Este estudo prévio permitiu determinar a melhor concentração de PS (0,3%) como sendo capaz de induzir uma maior imunoestimulação em *L. vannamei* (dados não apresentados) e esta concentração foi então selecionada para o experimento definitivo.

2.2. Animais e Desenho Experimental

Para esse estudo foram utilizados, machos e fêmeas de *L. vannamei* (13 ± 1,5 g, n=320), aparentemente saudáveis e em estágio de intermuda, provenientes de um viveiro em consórcio com tilápias (*Oreochromis niloticus*) de uma fazenda de cultivo em São Francisco do Sul (SC). Os animais permaneceram em aclimação por 24 h antes de iniciar-se o experimento, foram separados em dois grupos e mantidos em aquários (50 L), com dois sistemas de recirculação de água fechados e totalmente independentes entre si, contendo água marinha filtrada (30‰). Os aquários contavam com aeração constante e temperatura de 22 ± 1,4°C. Os parâmetros físico-químicos da água foram verificados diariamente após o início do experimento.

Estes dois grupos foram inicialmente alimentados com ração suplementada com 0,3% PS (grupo PS+) ou desprovida de PS (grupo PS-). Este período de pré-alimentação teve por objetivo avaliar o potencial efeito estimulante dos PS sobre a imunidade de *L. vannamei*, independentemente do desafio com WSSV. Após 18 dias do início da alimentação, os grupos foram subdivididos em quatro tratamentos, onde o grupo PS+ originou os tratamentos T1 e T3 e o grupo PS-, originou os tratamentos T2 e T4. Cada tratamento foi composto por cinco réplicas (caixas de 50 L;

n=80/tratamento) e neste dia (Dia 0), os animais foram injetados com uma solução contendo ou não WSSV. Porém antes da infecção, a hemolinfa de alguns animais/réplica/tratamento foi coletada para a análise imunológica correspondente à pré-infecção (Dia 0) (Fig. 1). Os animais de cada tratamento foram então injetados com uma solução contendo (T1 e T2) ou não WSSV (T3 e T4) (ver item 2.2.2.). O mesmo esquema de alimentação continuou para cada tratamento, até o final do experimento que totalizou 32 dias. Três coletas de hemolinfa foram realizadas ao longo do experimento (Fig. 1) a fim de avaliar-se a imunocompetência dos animais: nos dias **18°** (após o início da alimentação e que correspondeu ao Dia 0 ou pré-infecção), **21°** (correspondendo ao 3° dia pós-infecção) e **32°** (correspondendo ao 14° dia pós-infecção) (Fig. 1).

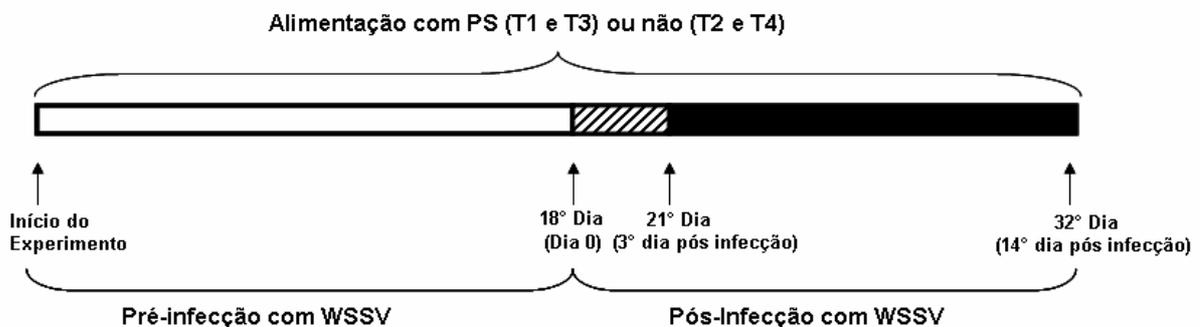


Fig. 1. Esquema explicativo do desenho experimental. Início do experimento corresponde ao início da alimentação dos animais por 18 dias com ração acrescida (grupo PS+) ou não (grupo PS-) com PS; **18° dia**: primeira coleta de hemolinfa (Dia 0 pré-infecção), seguida por injeção dos animais com solução contendo vírus da mancha branca (WSSV) (T1 e T2) ou não (T3 e T4); **21° dia**: segunda análise imunológica, correspondendo ao **3° dia pós-infecção**; **32° dia**: terceira análise, correspondendo ao **14° dia pós-infecção**.

2.2.1. Preparo do inóculo com WSSV e determinação da DL_{50} correspondente a 30% de mortalidade dos animais

Inicialmente, um inóculo de WSSV foi preparado segundo metodologia adaptada de Prior et al. (2003). Para isto, 10 g de tecido muscular congelado de camarões, diagnosticados como positivos para WSSV (análise de PCR, item 2.2.3.) foram homogeneizados em Tris-NaCl estéril (20 mM Tris, 0,4 M NaCl, pH 7,4) (1:10 p/v) e em seguida centrifugado a 2.000 xg , por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e recentrifugado a 9.000 xg , por 10 min a 4°C, para em seguida ser filtrado (0,45 μm) em condições estéreis. A solução viral foi alíquotada (200 μl) e mantida em nitrogênio líquido (-196°C), sendo que uma parte do filtrado foi imediatamente utilizada para se determinar a DL_{50} capaz de causar 30% de mortalidade nos animais, segundo o protocolo de Reed e Muench (Meslin et al., 1996). Para tal, procedeu-se a diluição seriada do inóculo em tampão Tris-NaCl estéril, em diferentes concentrações (10^{-3} à 10^{-9}) e, imediatamente, cada uma destas soluções foi injetada intramuscularmente (50 μl entre o 1° e 2° segmentos dorsais) em 6 animais. Durante os 14 dias que se seguiram, o comportamento dos animais foi observado, bem como a mortalidade monitorada e registrada. Os animais mortos foram amostrados para verificar a presença do WSSV por PCR (item 2.2.3.) e imediatamente destruídos por calor. A diluição da solução viral de 10^{-9} foi a que correspondeu a 0,35 DL_{50} e que causava aproximadamente 30% de mortalidade dos animais em

14 dias. Esta diluição foi então utilizada para a infecção dos animais no experimento definitivo (item 2.2.2.). Simultaneamente, uma solução de tecido muscular livre de WSSV (diagnosticada por PCR) foi preparada para servir de inóculo aos grupos de animais não-infectados com WSSV (T2 e T4).

2.2.2. Infecção experimental dos camarões com WSSV

Após 18 dias de alimentação, os animais dos tratamentos T1 e T2 (Fig. 1) foram inoculados com 0,35 DL₅₀ (diluição 10⁻⁹) da solução viral, enquanto os T3 e T4 foram injetados com a solução livre de WSSV (diluída a 10⁻⁹). Antes da injeção, a hemolinfa (pools de 3-4 animais/tratamento) foi coletada para análise dos imunoparâmetros, constituindo a análise do “dia zero ou pré-infecção”. Os animais cuja hemolinfa foi coletada foram imediatamente descartados, não retornando ao experimento. Os animais inoculados foram monitorados constantemente e a mortalidade registrada diariamente. Animais mortos foram retirados das caixas antes que os demais pudessem iniciar o processo de canibalismo, evitando assim uma possível reinfecção horizontal. A água utilizada durante os experimentos, assim como todos os equipamentos foram desinfetados por hipocloração (30 mg/l de hipoclorito de cálcio) segundo normas da OIE (2006).

2.2.3. Detecção do WSSV, através da amplificação do DNA viral por PCR

Após cada coleta de hemolinfa (dias 0, 3 e 14 pós-infecção), pleópodes e hemócitos de 9 animais/tratamento foram coletados para diagnosticar a presença do WSSV. Os pleópodes foram lavados em Tris-NaCl e armazenados em etanol 70%, e os hemócitos foram centrifugados (800 xg, por 10 min a 4°C) e ressuspensos em etanol 70%, para posterior extração do DNA genômico e amplificação viral. No caso dos pleópodes, 100 mg de tecido foi lavado 5x em água MilliQ, e centrifugado a 4.000 xg, por 5 min a 4°C. O tecido foi ressuspensado em tampão de lise (100 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 50 mM EDTA), macerado mecanicamente e acrescido de 2,5 µl de proteinase K (20 mg/ml – concentração final 100 µg/ml) e 50 µl de SDS a 10% (concentração final a 1%). A mistura foi então incubada *overnight* a 65°C e o DNA genômico extraído (DNAzol, Invitrogen). No caso dos hemócitos, após centrifugação (800 xg, por 10 min a 4°C), o pellet celular foi ressuspensado (3x) em 10 mM Tris (pH 7,5) e centrifugado a 2.000 xg, 10 min a 4°C. O DNA genômico foi então extraído (DNAzol) e ambos os DNAs dos pleópodes e dos hemócitos foram solubilizados com 8 mM NaOH (100 a 300 µl). A pureza das amostras de DNA foi avaliada em espectrofotômetro (A_{260/280nm}) (Biowave II - WPA). A integridade do DNA genômico foi realizada através da amplificação da actina.

A presença do WSSV foi monitorada a partir de 3 diferentes jogos de iniciadores, desenhados a partir de sequências gênicas de proteínas do WSSV depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/). Dois dos jogos utilizados foram os normalmente preconizados pela OIE (www.oie.int/eng/normes/fmanual/Asummary.htm): sendo eles: **(A)**

WSSV146Fw1: 5'ACTACTAACTTCAGCCTATCTAG3'; **WSSV146Rv1**: 5'TAATGCGGGTGTAATGTTCTTACGA3' (amplicon 1447 pb); **(B) WSSV146Fw2 (NESTED PCR)**: 5'GTAAGTCCCTCCATCTCCA3'; **WSSV146Rv2**: 5'TACGGCAGCTGCTGCACCTGT3'

(amplicon 941 pb). O terceiro jogo de *primers* foi referente a uma sequência da VP19 (proteína do envelope viral de WSSV) (GenBank: EU012447) **VP19Fw**: 5'ATGGCCACCACGACTAACACT3'; **VP19Rv**: 5'CTGCCTCCTCTTGGGGTA3' (amplicon 375 pb). As condições ótimas de PCR (temperatura de ligação dos iniciadores e número de ciclos) para **WSSV146** foram 94°C por 4 min, 55°C por 1 min, 72°C por 2 min, seguido por 39 ciclos (94°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min), e 72°C durante 5 min. No caso dos iniciadores **VP19** as condições foram otimizadas em 94°C durante 5 min, seguidos por 30 ciclos (94°C por 45 s, 67°C por 45 s e 72°C por 45 s), e 72°C durante 10 min. A confirmação da presença ou não de sequências gênicas referentes ao vírus foi então confirmada através da visualização em fotodocumentador (UV) das bandas correspondentes a cada *amplicon* esperado, em gel de agarose (1,2%), corado com brometo de etídio.

Além da análise de PCR convencional, as amostras coletadas nos dias 3 e 14 pós-infecção foram submetidas a uma PCR em tempo real (Rotor Gene 6000, Corbett Life Science) utilizando-se o kit DyNAmo™ SYBR® Green qPCR (Finnzymes), a partir de 54 a 264 µg de DNA genômico, 10 µM Master mix, 0,3 µM de cada primer (VP19 acima), para um volume final de 20 µl. As condições ótimas da reação para os *primers* foram otimizadas em 94°C durante 5 min, seguido por 30 ciclos (94°C por 45 s, 58°C por 45 s e 72°C por 45 s), e 72°C durante 10 min.

2.3. Coleta de hemolinfa e análise dos imunoparâmetros

A coleta de hemolinfa seguida da análise dos imunoparâmetros foi realizada em três diferentes dias do experimento: Dia zero (0) ou pré-infecção e dias 3 e 14 pós-infecção. A coleta de hemolinfa foi constituída por 3 *pools* de 3 animais/tratamento para todos os imunoparâmetros, exceto para a quantificação da produção de ânions superóxido, onde foram utilizados 4 animais/tratamento. Para tal, 1 ou 2 animais foram aleatoriamente coletados de cada réplica, de maneira que animais de todas as réplicas e de todos os tratamentos foram simultaneamente analisados (contabilizando 9 animais por coleta). No caso da produção de ânions superóxido, os animais também foram coletados aleatoriamente em cada réplica (n= 2 ou 3), contabilizando 12 animais por coleta.

A hemolinfa foi coletada, da região ventral abdominal higienizada com etanol 70%, utilizando-se uma seringa de 1 ml (agulha de 13 x 0,45; 26 G1/2") previamente resfriada (4°C). Imediatamente, uma parte do volume retirado foi depositada em um microtubo contendo uma das seguintes soluções anticoagulantes: **AC1** (400 mM NaCl, 100 mM glicose, 30 mM citrato de sódio, 10 mM EDTA, 26 mM ácido cítrico, pH 6,5) ou **AC2** (27 mM citrato de sódio, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 9 mM EDTA, pH 7,4), na proporção 1:2 (hemolinfa: AC). Esta hemolinfa, denominada de *hemolinfa total* (plasma + hemócitos) foi utilizada para os hemogramas, atividade da α 2-macroglobulina, atividade de PO e concentração protéica. A análise de produção de ânions superóxido utilizaram hemócitos coletados em AC1. A outra parte da hemolinfa foi depositada em um microtubo e deixada coagular por 24 h a 4°C, para obtenção do soro (repetidas centrifugações a 2.000 xg, 10 min, 4°C) e posterior análise da capacidade aglutinante.

2.3.1. Contagem Total (CTH) e Diferencial de Hemócitos (CDH)

Para a contagem total e diferencial de hemócitos, a hemolinfa (30 μ l) de cada amostra foi misturada a uma solução SIC-EDTA (450 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM EDTA, pH 7,2) (proporção 1:9), acrescida de 4% formaldeído. O número das células foi então estimado em câmara de Neubauer, em triplicatas. A contagem diferencial de hemócitos foi realizada em microscopia de contraste de fase (MCF). Estimando-se a porcentagem relativa das populações de hemócitos circulantes contando-se aleatoriamente um mínimo de 100 células por *pool*.

2.3.2. Atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina (α 2M) – Ensaio de proteção de protease

A atividade da α 2M foi avaliada através do ensaio de proteção de protease (tripsina) (adaptado de Armstrong et al., 1996). Para tal, alíquotas de 50 μ l de hemolinfa total (pool de 3 animais por tratamento/coleta) foram depositadas em poços de uma microplaca (fundo chato) e incubados com o mesmo volume de uma solução de tripsina (concentração final 5 μ g) diluída em Tris/NaCl (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4), por 15 min a 30°C. Em seguida, 50 μ l de inibidor de tripsina de soja (Sigma; concentração final 50 μ g, também diluído em Tris/NaCl) foram adicionados em cada poço e a mistura incubada por 10 min, a 30°C. Após incubação, uma solução do peptídeo cromogênico BApNA (N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride; Sigma; concentração final 0,83 mM) foi adicionada à mistura. A liberação do peptídeo cromogênico foi analisada espectrofotometricamente (Absorbância 405 nm). A atividade da α 2M (avaliada indiretamente através da atividade da tripsina imobilizada) foi expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína, onde uma unidade da atividade correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína, a 20°C. Como controle positivo da reação, a hemolinfa total de camarão foi substituída por plasma humano (diluído 3x em Tris/NaCl); no controle negativo a hemolinfa total de camarão foi incubada com tampão. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.3.3. Quantificação da produção intracelular de ânions superóxido (O_2^-)

A produção de O_2^- , pelos hemócitos de *L. vannamei* foi quantificada pelo método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*, Sigma), segundo protocolo descrito por Guertler (2007). Para tal, a hemolinfa coletada em AC1 de cada amostra foi centrifugada a 800 *xg*, por 10 min a 4°C e os hemócitos recuperados e ressuspendidos em solução salina para *Penaeus* (SS-P: 5,4 mM KCl, 2,6 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 400 mM NaCl, 2 mM NaHCO₃, pH 7,6) e lavados (uma vez) com a mesma solução por centrifugação. Uma suspensão de hemócitos (100 μ l) contendo 2,5 x 10⁶ cél/ml foi preparada em SS-P depositada nos poços de uma microplaca estéril (fundo chato) e deixados aderir por 10 min, a 20°C. As monocamadas celulares foram então cuidadosamente lavadas duas vezes com SS-P a 4°C e incubadas com os indutores (100 μ l): LPS (100 μ g/ml em SS-P) ou laminarina (β -1,3 glicanas; 2 mg/ml) e o NBT 3% (substrato do ânion superóxido). As monocamadas controle

receberam NBT e SS-P, sem os indutores. As monocamadas foram incubadas por 15 min a 20°C, no escuro. Após, o sobrenadante foi removido e as células fixadas com metanol absoluto (10 min), e lavadas (três vezes) com metanol 70%. Após secagem ao ar, as células foram rompidas com KOH 2 M (120 µl) e a seguir tratadas com DMSO (140 µl) para solubilizar o precipitado azul de formazan. O conteúdo azul foi transferido para uma nova microplaca e mensurado espectrofotometricamente (630 nm). Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.4. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da enzima PO foi avaliada depositando-se hemolinfa total (10 µl) de cada amostra em poços de uma microplaca (fundo chato) em presença de 10 µl de tripsina (1 mg/ml em água ultrapura) e 250 µl do substrato enzimático, L-DOPA (3 mg/ml) em água ultrapura. Os hemócitos foram rompidos por choque hipotônico liberando seu conteúdo intracelular. A formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo foi quantificada em leitor de microplacas a 490 nm, após 10 min de incubação a 20°C. A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína, onde uma unidade da atividade enzimática correspondeu ao aumento de 0,001 na absorbância, por min e por miligrama de proteína a 20°C (Söderhäll e Häll, 1984). A atividade basal (PO já presente no plasma) foi quantificada incubando-se a amostra com água ao invés de tripsina. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

2.3.5. Avaliação da capacidade aglutinante da hemolinfa

A titulação de aglutininas/lectinas na hemolinfa foi realizada utilizando-se amostras de 50 µl de soro (pool de 3 animais por tratamento/coleta) diluídas serialmente em TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5mM MgCl₂, pH 7,4) em microplacas de 96 poços (fundo em “U”) e incubadas com 50 µl de uma suspensão de eritrócitos de cão a 2% em TBS por 2 h a 25°C, em câmara úmida. No controle, o soro dos camarões foi substituído por TBS. O título aglutinante natural do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.3.6. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)

A concentração de proteínas totais da hemolinfa (pools de 3 animais por tratamento/coleta) foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como proteína padrão. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos das análises de hemogramas, produção de ânions superóxido, atividades da PO e α2M, capacidade aglutinante e CP da hemolinfa, foram inicialmente submetidos a uma

análise de variância (ANOVA), usando-se um teste de uma via, onde o fator principal foi o tratamento dentro de cada tempo (dia 0, 3 e 14 pós-infecção). Em seguida foi utilizado o teste de comparação de médias de Duncan. Na sequência, outro teste de uma via foi utilizado para avaliar a data de coleta dentro de cada tratamento, seguido do teste de comparação de médias Dunnett, que designou os valores do dia 0 (grupos PS+ e PS-) como os controles respectivos para T1/T3 e T2/T4. Por fim, um teste de duas vias foi então utilizado, onde os fatores foram a data de coleta (dia 3 e 14 pós-infecção) e o tratamento, seguido por um teste de comparação de médias *Post-hoc Contrasts for LS means*.

Os valores de porcentagens de hemócitos granulares e hialinos foram transformados para arcoseno, e os da atividade aglutinante para Log_2 , por não apresentarem homogeneidade de variância. Os dados referentes à sobrevivência dos animais no final do experimento foram analisados pelo teste de comparação entre duas proporções unilaterais.

3. Resultados

3.1. Detecção do DNA viral (WSSV) no inóculo e tecidos dos animais injetados

Uma banda de tamanho correspondente ao *amplicon* esperado (375 pb) foi encontrada no inóculo fresco, por PCR, utilizando o iniciador VP19 (linha 2, Fig. 2). Esta solução foi estocada por 30 dias a -196°C . No entanto, as amostras de DNA genômico dos hemócitos e pléopodes dos animais injetados (T1 e T2) não revelaram a presença do vírus nos dias 3 e 14 após a injeção, nem por PCR convencional, ou PCR em tempo real (dados não apresentados).

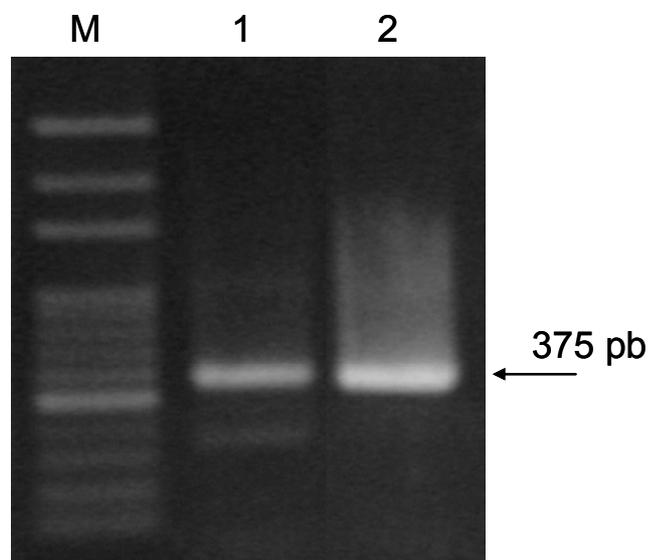


Fig. 2. Perfil eletroforético em gel de agarose (1,2%) do fragmento amplificado (375 pb) correspondente a proteína de envelope VP19 do WSSV. M: marcador de peso molecular (100 pb); 1: controle positivo (*L. vannamei* infectado com WSSV); 2: Inóculo de WSSV utilizado no experimento.

3.2. Determinação da diluição do inóculo para a infecção experimental

A diluição do inóculo que gerou uma mortalidade de 30% correspondente à $0,35 \text{ DL}_{50}$, foi determinada como sendo 10^{-9} . Esta diluição foi então utilizada para infectar os animais T1 e T2 (item 3.2.2). Animais injetados com altas concentrações da solução viral começaram a morrer em 72 h.

3.3 Análise dos Imunoparâmetros

3.3.1. Contagem Total de Hemócitos (CTH)

No período de pré-infecção não houve diferença significativa entre a CTH dos animais tratados (PS+) ou não (PS-), por 18 dias, com ração acrescida com PS (Fig. 3), apesar de se observar uma tendência a menores valores nos animais tratados. No entanto, após 3 dias da infecção, os grupos não alimentados com PS registraram uma queda significativa de 38% na CTH dos animais infectados com WSSV ($T2=17,55 \pm 6,19 \times 10^6$ céls/ml), em relação à pré-infecção ($PS- = 28,3 \pm 5,3 \times 10^6$ céls/ml) ($p \leq 0,05$). Os animais controle ($T4$) também registraram uma queda na CTH de 48% no período. Interessante, contudo, que a CTH dos animais previamente tratados com PS mantiveram seus valores de CTH mesmo após a infecção com WSSV ($T1$) ou diluente ($T3$) (Dia 3, Fig. 3). No 14º dia, a CTH dos animais $T2$ aumentou significativamente ($24,1 \pm 2,6 \times 10^6$ céls/ml), se igualando ao valor da pré-infecção e sendo superior àquela dos animais não infectados ($T3$ e $T4$) (Fig. 3). De uma maneira geral, a CTH dos animais, 14 dias pós-infecção, foi baixa, porém apenas significativamente diferente da pré-infecção no grupo controle, $T4$.

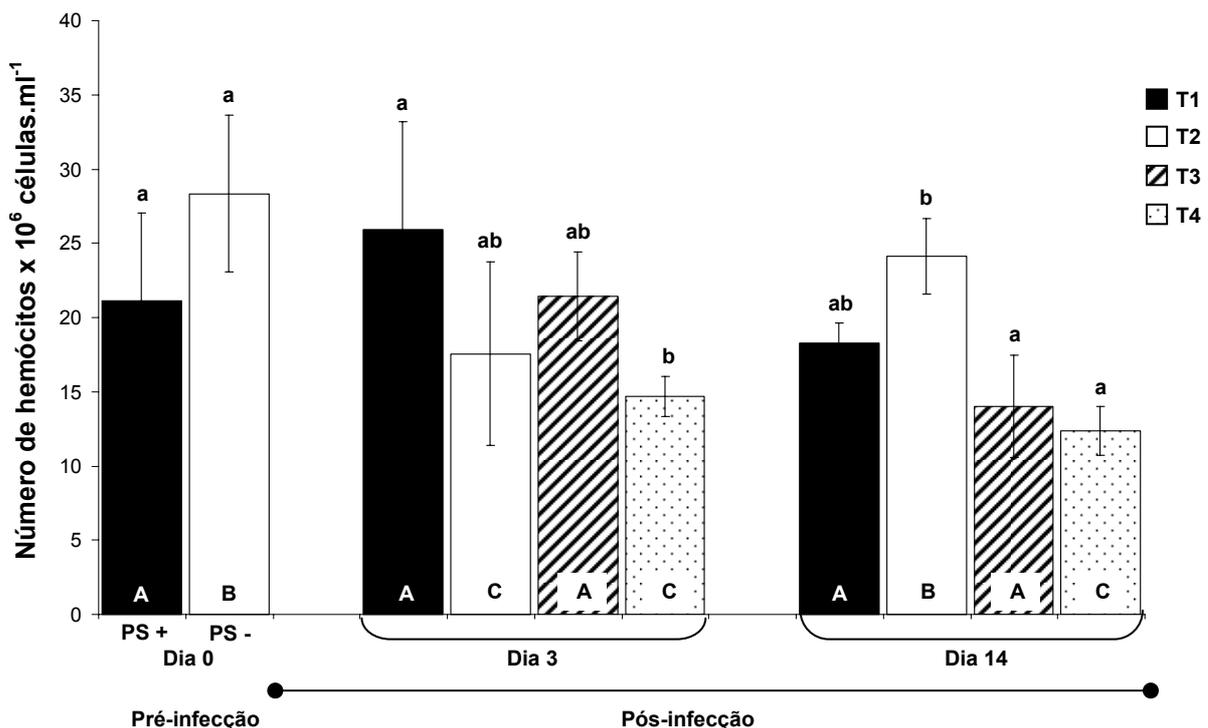


Fig. 3. Contagem total de hemócitos (CTH) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Os animais do grupo "PS+" (Dia 0, pré-infecção) foram alimentados com polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria birdiae* (PS) por 18 dias e, em seguida, infectados ($T1$) ou não ($T3$) com WSSV. Os animais do grupo "PS-" foram alimentados com ração sem PS e após, infectados ($T2$) ou não ($T4$) com WSSV. As barras representam à média \pm DP da CTH (3 pools de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CTH de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CTH dos animais tratados com PS (PS+, $T1$, $T3$) analisadas em separado dos animais tratados sem PS (PS-, $T2$ e $T4$), ao longo do experimento.

3.3.2 Contagem Diferencial de Hemócitos (CDH)

Dentre os diferentes tipos de hemócitos circulantes, os hemócitos granulares (HG) se mostraram, como esperado, o tipo de célula predominante em todas as análises. Na pré-infecção (dia 0) a porcentagem de cada tipo de hemócito nos animais foi semelhante entre os tratamentos (cerca de 90% para os HG e 10% para os HH). Contudo e de maneira interessante, após 3 dias da infecção, observou-se uma alteração significativa na relação inicial de HG/HH dos animais infectados com WSSV (linha vermelha na Fig. 4), independentemente se tratados (T1) ou não com PS (T2), havendo uma queda brusca no número de HG (porcentagem 27%) (Fig. 4). Já nos animais não-infectados (T3 e T4) a relação HG/HH permaneceu semelhante à pré-infecção. Curiosamente, após 14 dias da infecção os tratamentos T1 e T2 apresentaram um retorno à porcentagem inicial das populações de hemócitos circulantes na hemolinfa, ficando os valores muito próximos aos registrados na análise do dia 0 (Fig. 4).

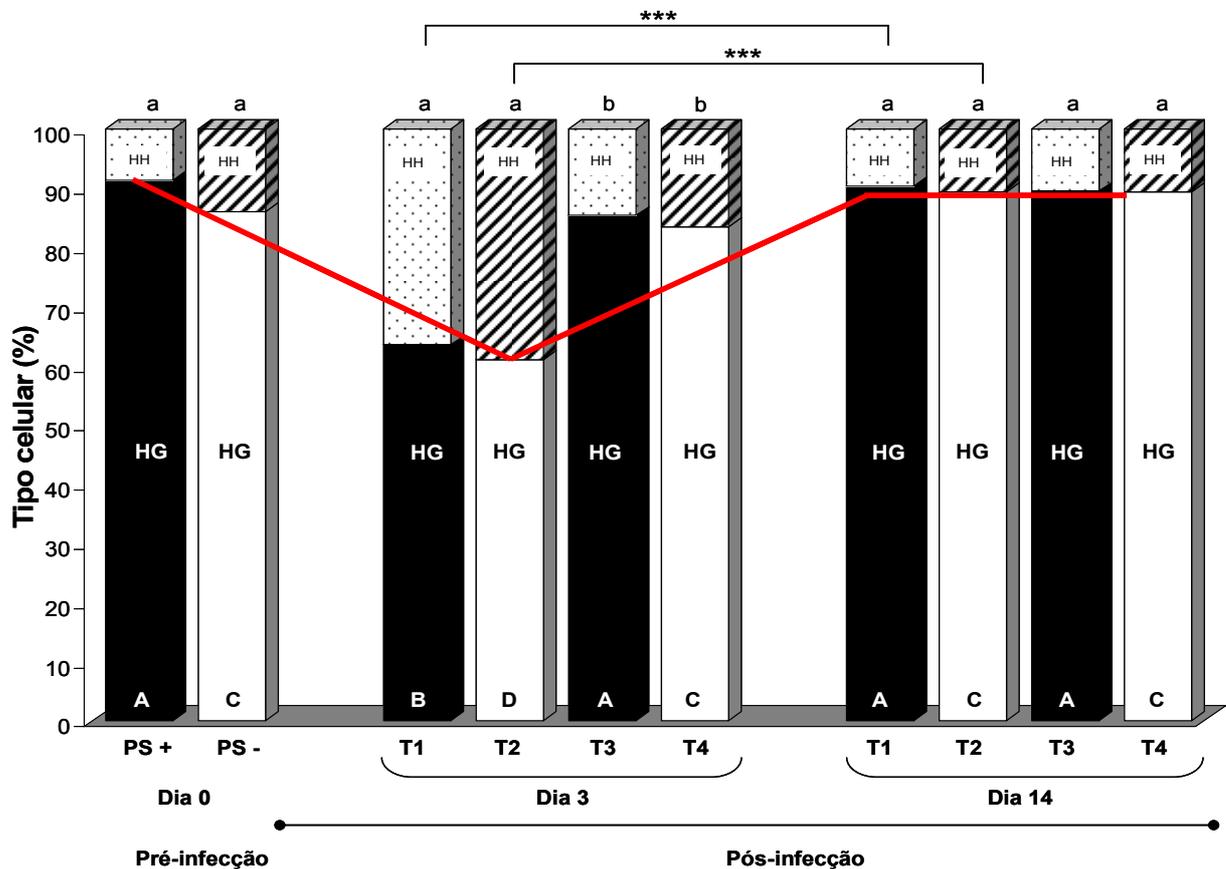


Fig. 4. Porcentagem de hemócitos granulares (HG) e hialinos (HH) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção dos animais com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP (3 pools de 3 indivíduos/tratamento). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a DHC de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as DHC dos animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisadas em separado dos animais tratados sem PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da DHC dentro do mesmo tratamento, após injeção.

3.3.3. Atividade do inibidor de proteases $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2M$) - Ensaio de proteção de protease

No período de pré-infecção, a atividade da $\alpha 2M$ mostrou-se mais baixa que nas demais análises, sendo semelhante entre os animais tratados ou não com PS (0,67 U/min/mg). Porém após a

injeção dos animais (3° dia), essa atividade aumentou em todos os tratamentos (Fig. 5), especialmente nos animais infectados com WSSV (T1 e T2) cujo aumento foi de no mínimo cinco vezes ($3,35 \pm 0,54$ e $4,72 \pm 0,62$ U/min/mg, respectivamente). Curiosamente, os animais não tratados com PS (T2) registraram a maior média de atividade da $\alpha 2M$, embora esta não tenha sido estatisticamente diferente de T1 (tratado com PS). Os animais controle (T4) foram os que registraram a menor atividade em todas as análises (Fig. 5). Já no 14° dia pós-infecção, observou-se em todos os tratamentos uma atividade da $\alpha 2M$ diminuída em relação ao terceiro dia, sendo que os valores se aproximaram daqueles da pré-infecção (Fig. 5). Os grupos alimentados com PS e/ou infectados com WSSV (T1, T2 e T3) apresentaram valores médios de atividade da $\alpha 2M$ mais altos que o grupo controle (T4). Além disso, observou-se que os animais alimentados com PS (T1 e T3) foram os que apresentaram a queda menos acentuada na atividade aos 14 dias, em relação à análise anterior (Fig. 5).

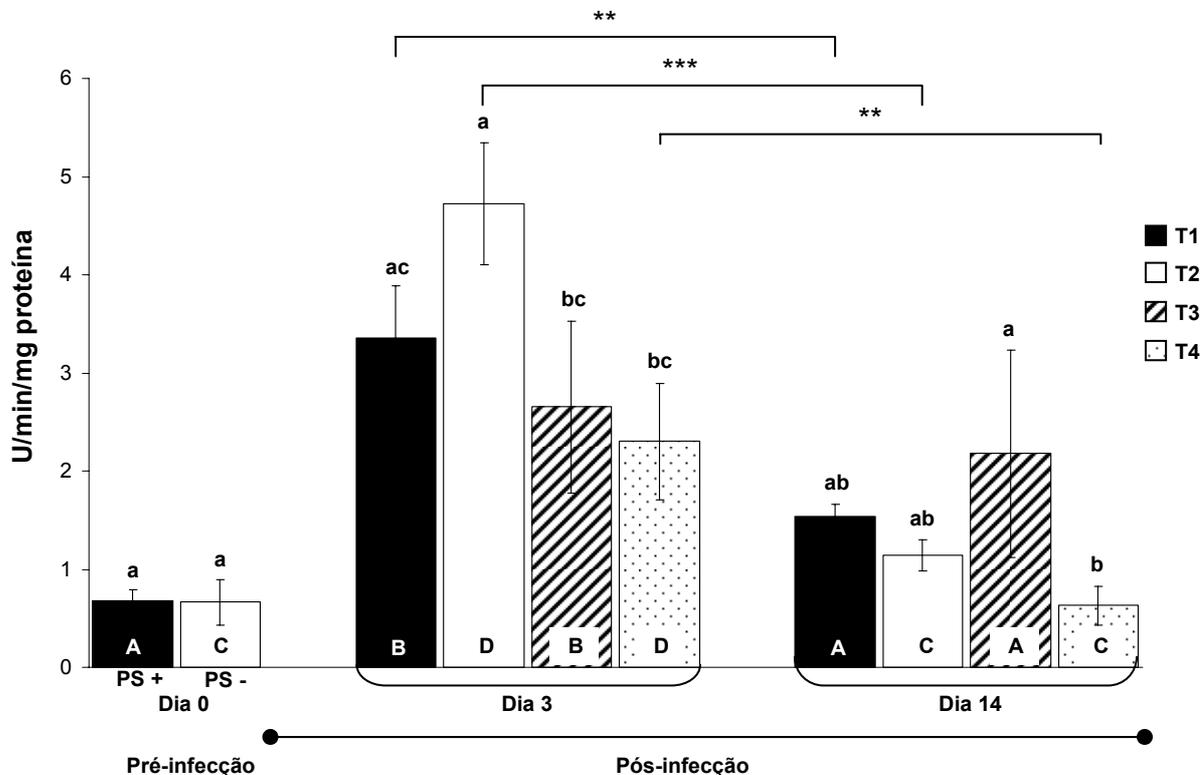


Fig. 5. Atividade da $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2M$) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP da atividade da $\alpha 2M$ (3 *pools* de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade da $\alpha 2M$ de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade da $\alpha 2M$ entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade da $\alpha 2M$ entre os tratamentos após a injeção.

3.3.4. Quantificação da produção intracelular de ânion superóxido (O_2^-)

Na pré-infecção, a produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos hemócitos dos camarões tratados com PS, por 18 dias, foi estimulada (cerca de 2x) por ambos indutores, laminarina (β -1,3-glicanas) e LPS, (Fig. 6). Já os hemócitos dos animais não tratados com PS foram estimulados apenas pelas β -1,3-glicanas (2x) e não pelos LPS. Após injeção, e no dia 3, observou-se que a

laminarina estimulou apenas os hemócitos dos animais controle (T4) (1,6x), sendo que os LPS induziram os hemócitos dos animais infectados e não alimentados com PS (T2) (1,6x) ($p=0,028$) (Fig. 6). Curiosamente, na análise do 14º dia pós-infecção, houve um aumento significativo na estimulação dos hemócitos dos camarões exclusivamente pelos LPS (2,5 a 3x superior à produção basal), especialmente nos animais infectados com WSSV (T1 e T2) (Fig. 6).

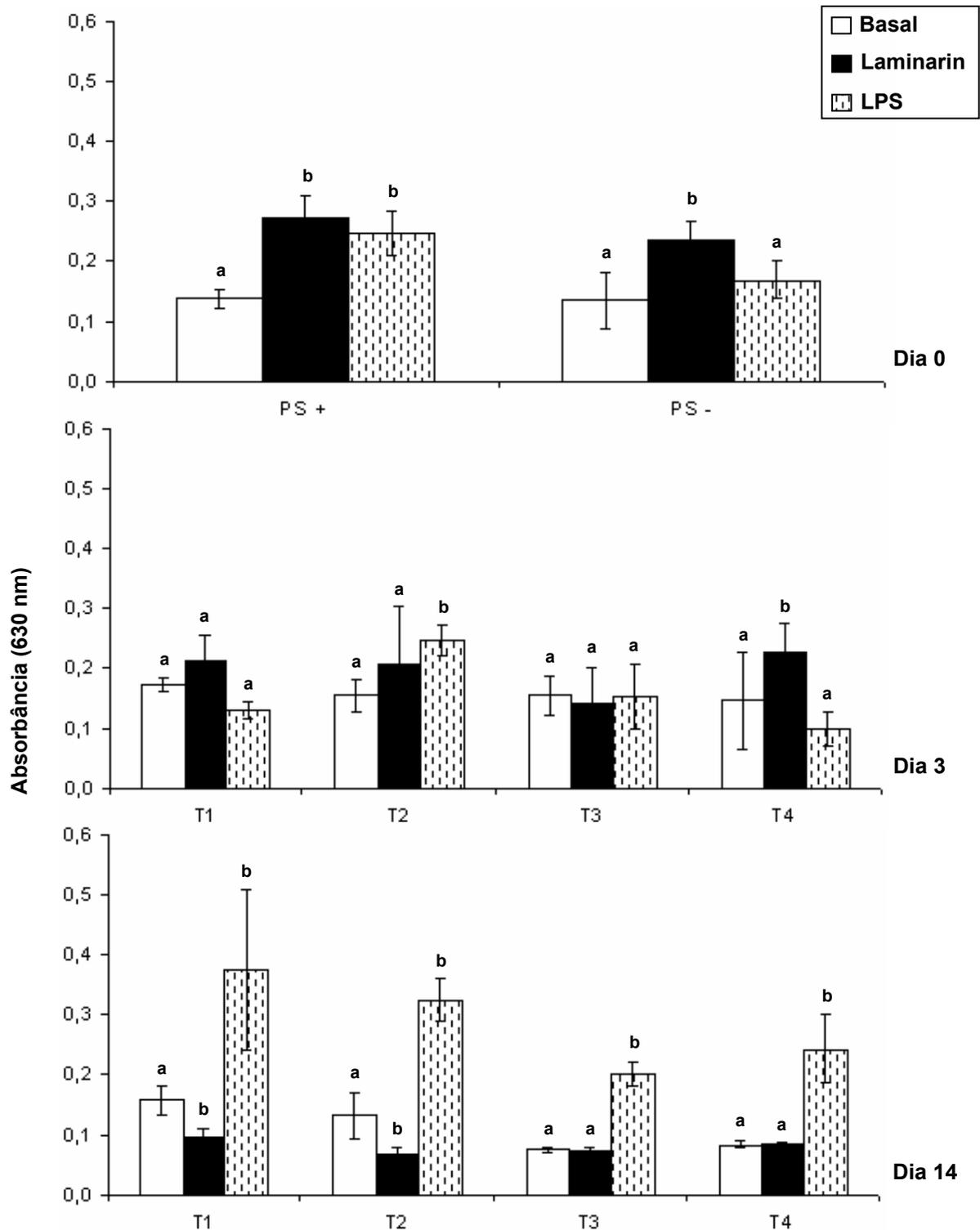


Fig. 6. Produção de ânions superóxido pelos hemócitos de *L. vannamei* estimulados *in vitro* por um dos indutores laminarina ou LPS (lipopolissacarídeo) e quantificada através do método de redução do NBT, nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção dos animais

com WSSV. As barras representam à média \pm DP da produção intracelular de O_2^- ($n=12$ /análise/tratamento). Letras minúsculas representam a estimulação celular significativa ($p \leq 0,05$) pelo indutor em relação à produção basal, dentro de cada tratamento e em cada análise.

3.3.5. Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO na hemolinfa dos animais no dia zero foi semelhante entre si (Fig. 7), independentemente do tratamento com PS. Já, após a infecção (dia 3) houve uma ligeira queda especialmente observada nos animais infectados com WSSV (T1 e T2). No entanto, esta diminuição na PO foi significativa apenas nos animais infectados com WSSV e não tratados com PS (T2). Nos animais tratados com PS e não infectados (T3) a atividade da PO permaneceu estatisticamente inalterada. Curiosamente, passados 14 dias, um aumento significativo na atividade da PO foi registrado nos animais tratados com PS, independente de terem sido infectados (T1) ou não com WSSV (T3). Neste período, o grupo controle (T4) também teve um aumento significativo na atividade da PO (1,5x).

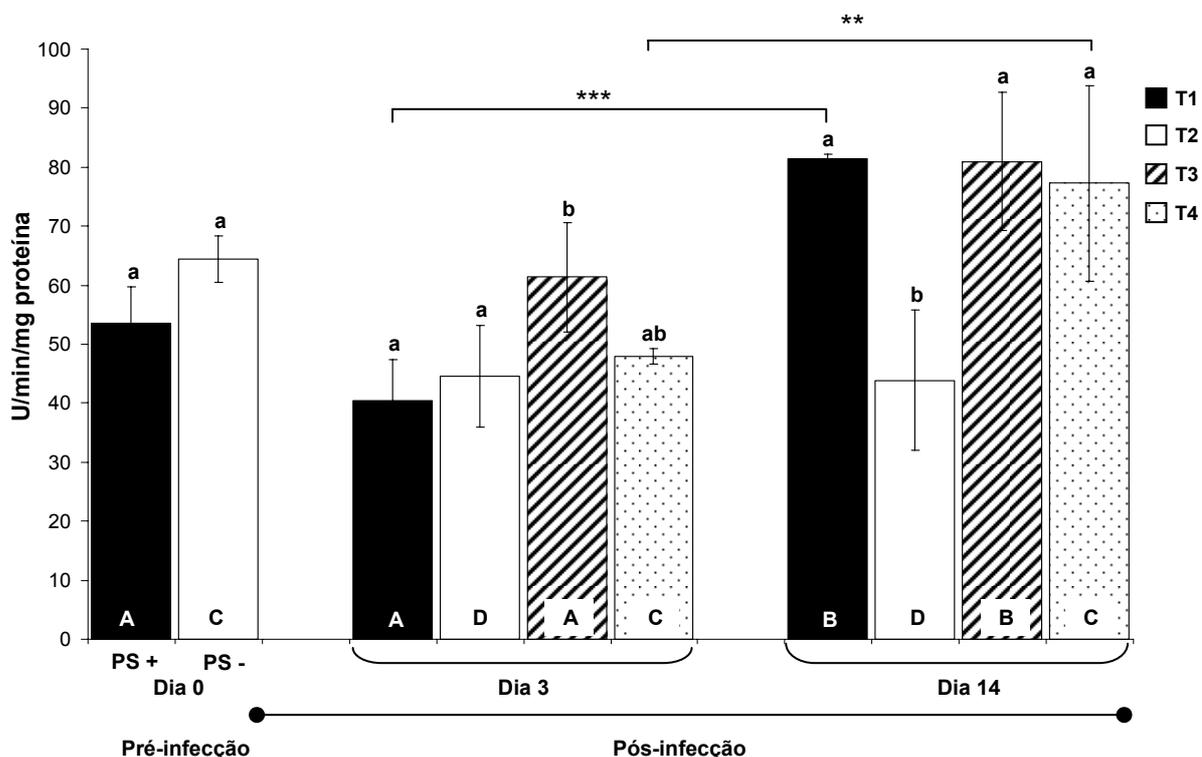


Fig. 7. Atividade da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com WSSV. As barras representam à média \pm DP da atividade da PO (3 pools de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade da PO de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade da PO entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade da PO entre os tratamentos, após a injeção.

3.3.6. Atividade aglutinante da hemolinfa

A capacidade hemaglutinante do soro dos camarões de todos os tratamentos e ao longo do experimento praticamente não se alterou, variando somente em alguns poucos casos (Fig. 8).

Apenas no 14° dia pós-infecção registrou-se um aumento significativo na capacidade aglutinante dos animais tratados com PS e infectados com WSSV (T1). Nos demais tratamentos, a capacidade hemaglutinante dos animais não sofreu alteração significativa.

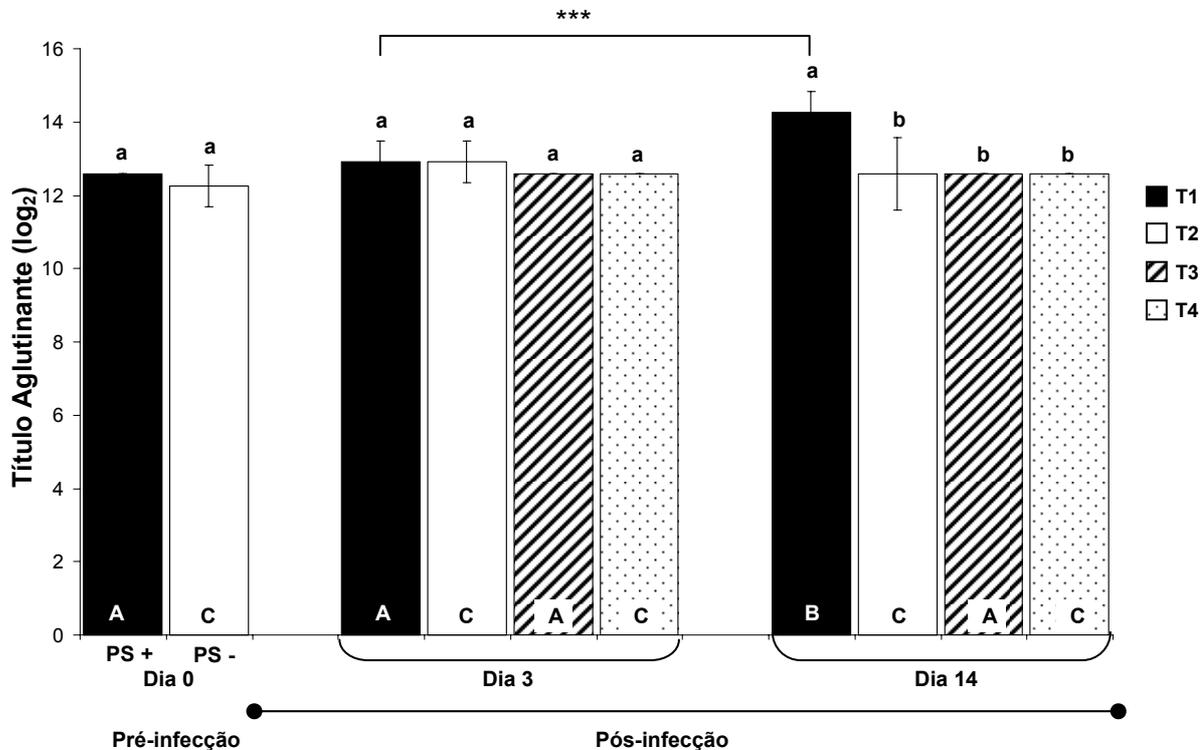


Fig. 8. Atividade aglutinante do soro de camarões, contra eritrócitos de cão em *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o vírus da mancha branca (WSSV). As barras representam à média \pm DP da atividade hemaglutinante (3 pools de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a atividade aglutinante em todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da atividade aglutinante entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da atividade aglutinante entre os tratamentos, após a injeção.

3.3.7. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP)

Na pré-infecção a CP dos animais tratados (PS+) ou não com polissacarídeos (PS-) foi semelhante entre si ($63,21 \pm 8,44$ e $60,10 \pm 4,95$ mg/ml, respectivamente) (Fig. 9). Após 3 dias da infecção, a CP em todos os grupos se manteve semelhante à pré-infecção, porém os animais infectados e não tratados com PS (T2) registraram uma maior CP ($63,56 \pm 9,42$ mg/ml) quando comparados aos animais infectados e tratados com PS (T1) ou ao grupo controle (T4) ($p \leq 0,05$). Um perfil semelhante de CP foi encontrado aos 14 dias pós-infecção, cujos valores permaneceram inalterados, com exceção novamente de T2, cuja CP aumentou significativamente ($80,6 \pm 17,20$ mg/ml) ao seu valor na pré-infecção ($60,10 \pm 4,9$ mg/ml) e também àquela da análise anterior ($63,56 \pm 9,42$ mg/ml) (Fig. 9).

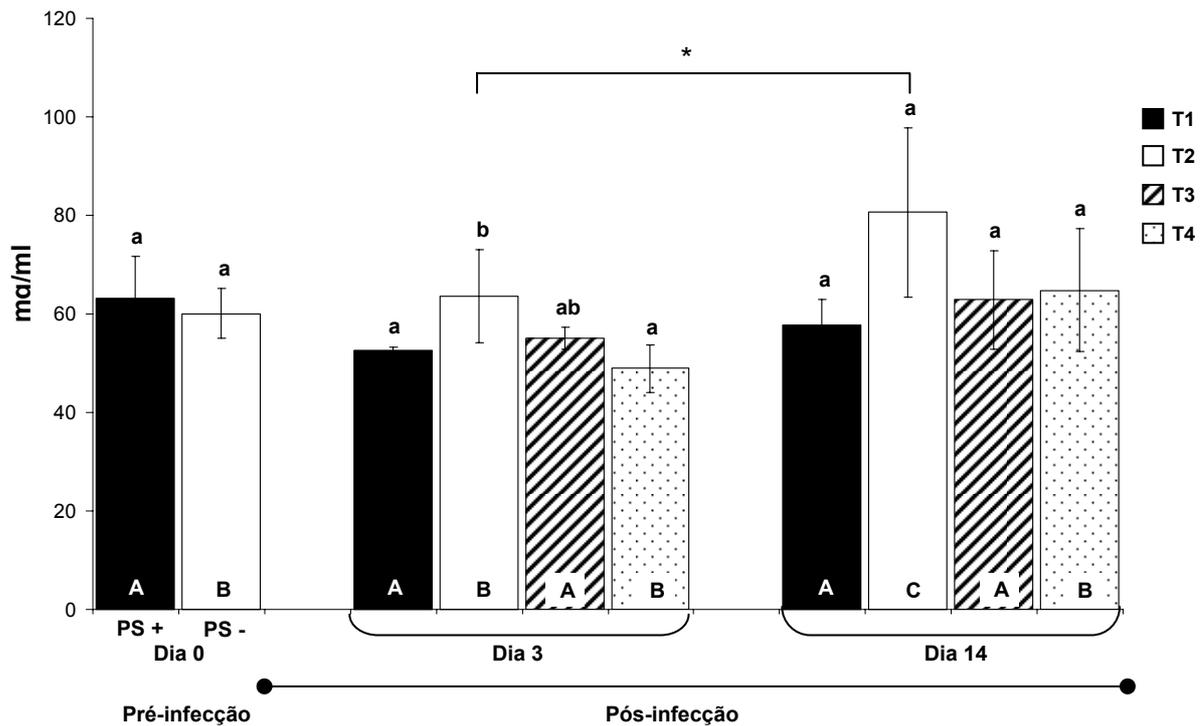


Fig. 9. Concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) de *L. vannamei* nos dias 0, 3 e 14 pós-infecção com o WSSV. As barras representam a média \pm DP da CP (3 pools de 3 indivíduos/tratamento/análise). Letras minúsculas representam as diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre a CP de todos os tratamentos, dentro de cada análise. Letras maiúsculas representam as diferenças estatísticas ($p \leq 0,05$) da CP entre os animais tratados com PS (PS+, T1, T3), analisados em separado dos animais não tratados com PS (PS-, T2 e T4), ao longo do experimento. Os asteriscos representam as diferenças significativas (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$) da CP entre os tratamentos, após a injeção.

3.4. Consumo alimentar e taxa de mortalidade cumulativa dos animais

Em análises prévias foi determinado que o consumo alimentar médio de *L. vannamei* (10-12 g) era de 1% do peso vivo (consumo de ração sem PS) (dados não apresentados). Entretanto, no experimento definitivo o consumo alimentar dos animais foi 50% inferior (0,5% do peso vivo), independentemente da infecção ou da dieta com PS (T1 e T3= 0,0054 g de ração/g de peso vivo/dia) ou sem PS (T2 e T4= 0,0055 g de ração/g de peso vivo/dia). Em relação à taxa de mortalidade cumulativa dos animais infectados com WSSV observou-se que aqueles que foram tratados com PS, por 32 dias, apresentaram uma taxa de mortalidade estatisticamente inferior aos animais alimentados com ração desprovida de PS. O grupo T1 teve uma mortalidade de 5%, enquanto que no grupo T2 a mortalidade foi de 16%, ou seja, 11% inferior ($p \leq 0,05$). A taxa de mortalidade prevista em 30% durante 14 dias utilizando 0,35 DL_{50} provocou uma mortalidade nos animais do experimento definitivo de apenas 16%. Além disso, não foi observada a presença de manchas brancas na carapaça dos animais infectados, porém estas manchas são mais comumente observadas em infecções severas e/ou em outras espécies de peneídeos, como *P. monodon*, sendo consideradas raras em *L. vannamei* (Nunes e Martins, 2002).

4. Discussão

A síndrome da mancha branca é uma das doenças virais mais graves que surgiram nos cultivos de camarões nas últimas décadas, sendo responsável por mortalidades maciças que ocorrem dentro de poucos dias após a infecção com o vírus (WSSV), e cujas perdas são catastróficas para a indústria camaroneira mundial (Lighthner, 2003). Desde o seu surgimento na década de 90, vários estudos vêm sendo conduzidos visando minimizar o impacto causado por esta enfermidade na carcinicultura.

No presente estudo o efeito estimulante dos polissacarídeos sulfatados (PS) da macroalga vermelha *G. birdiae* foi avaliado sobre o sistema imune de *L. vannamei*, experimentalmente infectados com baixas doses de WSSV (0,35 DL₅₀). Para tal, vários parâmetros hemato-imunológicos foram analisados em diferentes períodos após o desafio com a injeção do inóculo viral (dias 0, 3 e 14). Os hemogramas (CTH) dos animais tratados ou não com PS não se alteraram significativamente na pré-infecção, evidenciando assim que a alimentação com este composto (0,3% PS) por 18 dias, não levou a um aumento dos hemócitos na circulação. No entanto, após a infecção e no 3º dia, os animais alimentados com PS (T1) mantiveram seus hemogramas estáveis, enquanto que aqueles não alimentados (T2) registraram uma queda drástica na CTH de aproximadamente 40%, sugerindo que os PS de *G. birdiae* devam ter auxiliado, de alguma forma, na manutenção da quantidade de hemócitos circulantes em camarões com uma infecção branda por WSSV, talvez estimulando a produção de células pelo tecido hematopoiético. Esta hipótese não foi verificada, porém é respaldada pelo resultado obtido na contagem diferencial dos hemócitos (CDH) de T1, onde, mesmo tendo uma queda importante na quantidade de hemócitos granulares (HG), a CTH dos animais permaneceu inalterada, sugerindo fortemente a produção de novos hemócitos hialinos (HHs) no organismo.

Por outro lado, a diminuição da CTH nos camarões infectados com WSSV pode ter sido decorrente da infiltração dos hemócitos no local da infecção, de uma baixa reposição das células pelo tecido hematopoiético ou ainda de morte celular advinda de apoptose. É comumente relatado que os hemócitos circulantes de camarões diminuem durante as infecções virais (Hennig et al., 1998; Roux et al., 2002; Wongprasert et al., 2003; Sarathi et al., 2008). Por exemplo, em infecções severas de *L. vannamei* (aproximadamente 15g; 43.3% mortalidade em 3 dias) por WSSV, é relatado que em um primeiro momento (5 h após infecção) há um ligeiro aumento no número de hemócitos, seguido por uma queda brusca (aproximadamente 50%) nas 24 h seguintes e atingindo o seu pico mínimo na circulação 48 h pós-infecção (Ai et al., 2008). No entanto, apesar de uma queda nas primeiras 24 h observada em infecções moderadas (48%) ou baixas (34%) em *L. vannamei* (Pan et al., 2008), o número de células retornou aos valores normais dentro de 15 dias, semelhantemente ao encontrado em nosso estudo. Estes resultados conjuntos poderiam então indicar que o restabelecimento do hemograma de camarões infectados brandamente com WSSV ocorra em médio prazo, provavelmente devido à reposição celular pelo órgão hematopoiético.

Um fato relevante em nosso estudo é que os dois grupos de animais infectados com WSSV (T1 e T2), independentemente do tratamento com PS, tiveram um decréscimo significativo nos seus HGs (30%) no 3º dia pós-infecção, sendo que no 14º dia os valores se restabeleceram

(aproximadamente 90%). O declínio de HGs já foi relatado em *L. vannamei* com altas cargas virais de WSSV (Motesdeoca et al., 2001; Maldonado et al., 2003). Estes resultados não são surpreendentes, uma vez que sendo os HGs as células mais imunocompetentes dos camarões e as grandes depositárias das moléculas imunofetoras (Jiravanichpaisal et al., 2006), são as células mais ativamente recrutadas durante uma infecção viral. Além disso, são justamente os hemócitos granulares dos peneídeos (HGP e HGG) que são seletivamente infectados pelo WSSV (Wang et al., 2002) e isto explicaria a queda desta população hemocitária nos primeiros dias pós-infecção.

Esta diminuição dos HGs de *L. vannamei* infectados com WSSV provavelmente esteve associada à migração das células infectadas ao órgão linfóide e/ou à apoptose/necrose destas células, o que poderia ter sido demonstrado mediante análise histológica ou por detecção de apoptose. A apoptose de hemócitos é um dos mecanismos antivirais desencadeados em camarões infectados visando limitar a replicação viral e inibir a expansão da infecção para outros tecidos, sendo este mecanismo já descrito em peneídeos infectados com WSSV (Sahtout e Shariff, 2001; Leu et al., 2008; Wang e Zhang, 2008). Sabe-se que o órgão linfóide dos camarões é um tecido envolvido na depuração de hemócitos infectados por vírus (Anggraeni e Owens, 1998), onde são encontradas células apoptóticas infectadas, além de se observar a migração a este tecido de HGs contendo vírions dentro de esferóides.

O fato de a CDH manter-se estável somente nos animais não injetados com WSSV, independentemente do tratamento com PS, sugere que este composto não impediu a queda das principais células imunocompetentes dos camarões, os HGs, durante as primeiras 72 h da infecção viral. Apesar disto nossos resultados indicam que estes PS tenham induzido a produção de HH nos animais infectados com WSSV. Estes hemócitos estão envolvidos na fagocitose (Johansson et al., 2000) e coagulação da hemolinfa (Hose et al., 1990). Talvez os PS também tenham induzido a produção de HGs pelo tecido hematopoiético, porém, não o suficiente para ser detectada nas primeiras 72 h ou para reverter a queda desta população hemocitária na circulação dos animais infectados.

Relatos na literatura sobre a ação imunoestimulante destes compostos sobre os hemogramas de camarões são muito controversos e de difícil comparação, devido às diferentes metodologias e PS utilizados. Para exemplificar, tratamentos com polissacarídeos em *L. vannamei* não demonstraram alterações na CTH e CDH após alimentação com ração acrescida de alginato de sódio, durante 5 meses (Cheng et al., 2005), enquanto outros estudos mostram um aumento na CTH deste mesmo peneídeo após alimentação (6 dias) com ração acrescida de chá da alga vermelha *Gelidium amansii* (aproximadamente 23%) (Fu et al., 2007).

Outro imunoparâmetro que se alterou significativamente com a infecção de *L. vannamei* por WSSV, no presente estudo, foi a atividade do inibidor de proteases α 2-macroglobulina (α 2M), indiretamente avaliada através da atividade da tripsina imobilizada. Apesar de atividade ter aumentado em todos os animais no dia 3, este aumento foi independente do tratamento com PS. No entanto, este aumento foi especialmente observado nos camarões injetados com WSSV (seis vezes mais do que na pré-infecção), sugerindo que a presença do vírus deva modular a sua atividade, possivelmente aumentando a sua expressão gênica nos hemócitos, como já demonstrado em

estudos anteriores com outros crustáceos. Em *P. monodon* a expressão da $\alpha 2M$ foi aumentada nas primeiras 48 h de infecção por WSSV (Tonganunt et al., 2005) ou ainda após o tratamento com LPS (Vaseeharan et al., 2007) ou PGs bacterianos (Lin et al., 2007, 2008). Todos estes achados são relevantes, pois indicam que a $\alpha 2M$ deva participar das respostas imunológicas de camarões, possivelmente inibindo proteases do patógeno produzidas durante o processo infeccioso (Armstrong, 2006) e/ou regulando a ativação indiscriminada de sistemas proteolíticos, tais como o sistema proPO (Hergenbahn et al., 1988; Aspán et al., 1990). É interessante salientar que, apesar da atividade da $\alpha 2M$ não ser comumente utilizada como imunoparâmetro, os nossos resultados indicam que a sua avaliação pode contribuir para a detecção de alterações imunes advindas de infecções, e sugerimos a sua inclusão nas análises de imunoparâmetros em camarões.

Durante a fagocitose de microrganismos os hemócitos dos camarões produzem potentes substâncias microbicidas e citotóxicas, dentre eles os intermediários reativos de oxigênio (ROIs) (Bogdan et al., 2000). O tratamento de *L. vannamei* com PS de *G. birdiae* por 18 dias (pré-infecção) foi capaz de induzir a um aumento de duas vezes a produção intracelular do ânion superóxido (O_2^-), porém somente quando o LPS foi utilizado como indutor celular, e não a laminarina. Curiosamente, esta mesma imunoestimulação pelos PS não foi mais observada após a infecção com WSSV (T1, Dia 3), indicando que estes compostos não induziram a um aumento na produção destes ROIs justamente na fase inicial da infecção viral e isto, do ponto de vista imunológico, não é desejável uma vez que os ROIs, sendo potentes agentes microbicidas, poderiam auxiliar sobremaneira na contenção do processo infeccioso. Este resultado pode ser decorrente de um *burst* respiratório ocorrido em período anterior a 72 h da infecção, portanto não detectado, ou ainda, estar associados à baixa infecção viral a que os camarões foram submetidos.

Por outro lado, o aumento de aproximadamente 60% na produção intracelular de O_2^- verificada nos animais infectados e não tratados com PS (T2) sugere que a injeção com o vírus deva ter induzido à produção intracelular de O_2^- (LPS como indutor celular, novamente), semelhantemente ao observado em infecções virais nos mamíferos (Oda et al., 1989), e em camarões infectados com WSSV e/ou IHNV (Sarathi et al., 2008; Yeh et al., 2009). No entanto, estes trabalhos com camarões apresentam equivocados metodológicos fundamentais na técnica de NBT utilizada, o que leva a questionar a consistência dos resultados apresentados e dificultando assim maiores comparações. Em outro estudo, com uma metodologia passível de comparação, encontrou-se um aumento de 87% já na produção basal de O_2^- em *L. vannamei* infectados severamente com TSV (Song et al., 2003), sem ocorrer, no entanto, uma estimulação celular *in vitro* por β -1,3 e 1,6-glicanas. Curiosamente, as β -glicanas foram capazes de estimular hemócitos apenas dos animais que não estiveram em contato com TSV, assim como observado em nosso estudo com WSSV (pré-infecção e grupo controle, no dia 3). Essas observações conjuntas sugerem que os LPS sejam melhores indutores celulares *in vitro* que as β -glicanas, no caso de animais infectados com vírus (TSV ou WSSV). No entanto, outros estudos devem ser realizados para esclarecer esta questão.

De maneira interessante, um *burst* respiratório significativo e tardio (dia 14) foi encontrado nos hemócitos dos animais de todos os tratamentos, estimulados por LPS, não estando, contudo, associado ao tratamento com os PS. Embora, o fato desta estimulação não estar claramente

associada ao WSSV, ela foi particularmente maior nos animais infectados. Os motivos para tal estímulo ser tardio e induzido apenas pelos LPS são ainda desconhecidos, no entanto existe outro relato de estimulação de ROIs tardiamente em juvenis *P. monodon* alimentados com β -1,3-glicanas por 20 dias e posteriormente infectados com WSSV (DL₅₀ em 48 h) que uma queda importante na produção de O₂⁻ foi observada no 3° dia pós-infecção, seguida por um aumento progressivo nos dias subsequentes e cuja maior produção (120%) foi observada no 12° dia (Chang et al., 2003).

A biossíntese de melanina nos crustáceos é resultante da ativação do sistema pró-fenoloxidase (proPO) que é reconhecido como uma das principais respostas imunoefetoras nestes animais, desencadeada por LPS de bactérias Gram-negativas e β -1,3-glicanas de fungos (*vide* revisão Cerenius e Söderhäll, 2004). Neste estudo, a alimentação de *L. vannamei* por 18 dias com PS não mostrou alterar significativamente a atividade da PO. No entanto, a injeção dos animais com baixas concentrações de WSSV provocou uma queda na atividade enzimática no 3° dia, em ambos os animais, tratados ou não com PS ($p \leq 0,05$). Esta diferença não foi significativa entre os grupos T1 e T2, mas fica evidente que a injeção com WSSV levou a uma diminuição na atividade da PO nas primeiras 72 h, muito provavelmente estando relacionada à queda dos HGs observada no período. Vale lembrar aqui, que são os HGs que armazenam as formas zimogênicas proPO e a pró-serino protease ativadora da proPO (pró-ppA) (*vide* revisões de Cerenius e Söderhäll, 2004; Jiravanichpaisal et al., 2006) que iniciam a ativação do sistema. Em outros estudos foram também relatadas diminuições na atividade da PO, como em *L. stylirostris* após 16 e 32 h de infecção com WSSV (Roux et al., 2002) e *L. vannamei* infectados com o TSV, após 48-72 h da infecção (Song et al., 2003).

Outra hipótese não excludente da anterior, para explicar a queda da PO em nosso estudo, diz respeito à modulação negativa da expressão gênica da proPO pelo WSSV, uma vez que há relatos da diminuição na expressão do RNAm nos hemócitos de *L. vannamei* após 36 e 48 h de uma infecção severa por WSSV (Ai et al., 2008), demonstrando que efetivamente este vírus pode modular a expressão da proPO.

Um resultado interessante em nosso estudo diz respeito ao importante aumento tardio na atividade da PO em todos os animais (exceto T2), no 14° dia pós-infecção, registrando valores acima daqueles da pré-infecção e que coincide com o retorno na circulação dos níveis normais de HGs. Nos animais infectados, no entanto, este aumento foi somente observado em camarões alimentados com PS, reforçando aqui a idéia que os PS de *G. birdiae* devam ter contribuído para manter o sistema proPO ativo no início da infecção, e que, num segundo momento (14° dia) estimulou este sistema, aumentando a atividade da PO. Em outro estudo, com *P. monodon*, é relatado que após a alimentação com β -1,3-glicanas (20 dias) e infecção dos animais com WSSV (DL₅₀ em 48 h), uma queda significativa na atividade da PO foi observada logo após a infecção, voltando aos valores normais a partir do 3° dia (Chang et al., 2003). Estes resultados em conjunto, sugerem que a presença de certos polissacarídeos na ração, sulfatados (PS) ou não (β -1,3-glicanas), devam auxiliar na manutenção e/ou aumento da atividade da PO em camarões infectados com WSSV.

As aglutininas/lectinas são glicoproteínas com capacidade de se ligarem especificamente a carboidratos da superfície de diferentes células, incluindo microrganismos e causando sua aglutinação. A capacidade aglutinante do soro de *L. vannamei*, avaliada neste estudo, não

demonstrou nenhuma alteração no 3º dia pós-infecção com WSSV, ou relacionado ao tratamento com PS de *G. birdiae*. Novamente aqui, apenas no 14º dia é que se observou uma mudança no perfil deste imunoparâmetro, quando um aumento no título de lectinas foi exclusivamente detectado nos animais infectados e alimentados com PS (T1). Este resultado sugere que, como no caso dos ROIs e da PO, um estímulo tardio foi observado, associado aparentemente à alimentação dos animais com PS, no entanto a causa para esta resposta ser tardia permanece desconhecida. Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento de lectinas em respostas imunológicas de camarões infectados com vírus. Em duas espécies de camarões, a dulcícola *Macrobrachium rosenbergii* e a marinha *P. monodon* infectados com WSSV, foi encontrado um aumento de cerca de 40x na capacidade aglutinante do soro em *M. rosenbergii* após 48 h de infecção, bem como uma diminuição de aproximadamente 0,6x neste imunoparâmetro em *P. monodon*, espécie mais suscetível à WSSV (Pais et al., 2007). Além disso, em outro estudo, infecções severas de *L. vannamei* com WSSV provocaram um aumento na expressão gênica de duas lectinas do tipo-C (Zhao et al., 2007), indicando que altas viremias de WSSV modulam positivamente a expressão de lectinas em camarões nas primeiras 48 h da infecção. Sendo assim, a inalteração da capacidade aglutinante da hemolinfa de *L. vannamei* registrado no presente estudo pode estar associada à baixa viremia a que os animais foram inicialmente submetidos, diferentemente dos estudos acima citados, com infecções severas de WSSV.

A concentração de proteínas totais da hemolinfa (CP) de *L. vannamei* avaliada no presente estudo mostrou-se ligeiramente inferior ao longo de todo o experimento quando comparado aos valores usualmente descritos na literatura para esta mesma espécie e faixa de peso (90.8 ± 5.5 mg/ml) (Mercier et al., 2006), mantida em condições experimentais semelhantes às utilizadas neste estudo. A explicação mais plausível para este resultado seria que os animais registraram um baixo consumo alimentar durante todo o experimento (0,5% do peso vivo) decorrente provavelmente do fato de que esses animais, sendo oriundos de um policultivo com peixes, não estavam habituados a se alimentar com ração e isto demandaria, por conseguinte, um maior período de aclimação do que as 24 h aqui realizadas. O único grupo cuja CP se alterou, aumentando no 14º dia pós-infecção, foi a dos animais infectados e não alimentados com PS (T2). Os motivos para este aumento não estão claros, pois o consumo de ração foi estatisticamente igual em todos os tratamentos, não sendo observada nenhuma correlação entre baixa alimentação e o tratamento com PS.

Por outro lado, ficou evidente que a alimentação dos camarões com PS de *G. birdiae* por 32 dias propiciou um aumento significativo de 11% na taxa de sobrevivência dos camarões infectados com WSSV. Este resultado é muito interessante do ponto de vista prático, pois sugere que embora os PS de *G. birdiae* não tenham atuado como importantes agentes imunoestimulantes para *L. vannamei*, esses compostos associados à dieta (suplemento de 0,3%) poderiam aumentar a resistência de camarões submetidos a uma baixa infecção viral, como a realizada neste estudo com WSSV. Outros estudos relatam um aumento nas taxas de sobrevivência de camarões associados ao tratamento com PS de algas, como no caso de *P. monodon* infectados com WSSV, que tiveram 93% de sobrevivência quando alimentados com fuicodanas de *Sargassum polycystum* (200 mg/kg de peso vivo/dia) por 15 dias (Chotigeat et al., 2004) e em juvenis *L. vannamei*, infectados com IMNV e alimentados com PS

da macroalga vermelha *Botryocladia occidentalis* na quantidade de 4 g/kg de ração (sobrevida de 92%) (Costa et al., 2006) por 15 dias. O mecanismo de atuação destes compostos na sobrevivência e imunologia dos camarões infectados por vírus, assim como, a sua absorção (e se ocorre) pelo trato digestório dos animais, permanecem ainda totalmente desconhecidos merecendo ser investigado mais profundamente em estudos futuros.

O fato mais intrigante ocorrido neste estudo, contudo, foi a não detecção do DNA viral nos camarões após 3-14 dias da inoculação com WSSV. Convém ressaltar que o inóculo utilizado para infectar os animais foi adequadamente preparado e armazenado (-196°C, 30 dias), além de previamente avaliado por PCR quanto à presença do vírus e quanto ao seu poder infectivo. Sendo assim, não parece ser uma inativação do vírus no inóculo a causa para tal resultado. Outro fato relevante e que reforça esta hipótese, diz respeito aos resultados com os imunoparâmetros acima discutidos, onde vários deles se alteraram significativamente nas 72 h após a inoculação, sendo, portanto, um forte indício de que o organismo dos animais esteve, no mínimo, em contato com um agente estranho capaz de provocar alterações em sua imunidade.

Algumas hipóteses então são sugeridas para explicar tal fenômeno de ausência do DNA viral. Primeiramente devemos considerar que os animais foram injetados com uma baixa carga viral (0,35 DL₅₀). A escolha de uma baixa dose letal, neste estudo, objetivou uma aplicação prática posterior nos cultivos, onde a utilização de um composto imunoestimulante só se justificaria no caso dos animais estarem em fase inicial ou persistente de uma infecção, ou seja, com baixa viremia e não em animais moribundos, onde a carga viral seria tão grande que nenhum tratamento se mostraria eficaz. Em segundo lugar, a baixa viremia nos animais deve ter desencadeado diferentes respostas antivirais que foram eficientes ainda nas primeiras 72 h da infecção.

Dentre estas respostas uma seria a apoptose, onde se sabe que a sua indução precoce numa infecção viral é altamente desejável e capaz de limitar a produção de partículas virais, bem como reduzir ou eliminar a propagação viral para os outros tecidos do hospedeiro (Roulston et al., 1999). Se houve apoptose em estágio precoce da infecção (não avaliada neste estudo), isso deve ter permitido uma “limpeza” dos animais ainda nas primeiras 72 h, caracterizando assim um fenômeno conhecido por “*clearance* viral”, que pode ter sido particularmente favorecido pela baixa carga viral injetada nos animais.

Clearance viral e/ou cura da infecção é um fenômeno no qual o hospedeiro elimina do seu organismo os vírions através de vários mecanismos imunológicos e antivirais desencadeados simultaneamente durante uma infecção. Este fenômeno foi recentemente relatado em *M. rosenbergii* infectados severamente com WSSV (Sarathi et al., 2008), que segundo os autores desenvolveram resistência ao vírus a partir do 5º dia de infecção, advinda de *clearance* viral observada entre 25 a 50 dias pós-infecção. Vale ressaltar que estes animais foram injetados com um inóculo viral puro, portanto com carga viral alta, diferentemente do nosso estudo onde o inóculo foi bastante diluído (10⁻⁹), o que poderia explicar a diferença no tempo para a eliminação do vírus entre esses estudos.

Somando à hipótese de *clearance* viral nos animais do presente estudo, seria a sua associação a um outro fenômeno, também observado em camarões, conhecido por “interferência viral” (Tang et al., 2003). A interferência viral se caracteriza pela presença crônica de um vírus no

animal e que induz resistência à mortalidade por uma infecção posterior, por um outro vírus (Younger e Whitaker-Dowling, 1999). Em camarões sabe-se que atualmente o IHHNV pode infectar os animais nos cultivos de uma forma crônica e persistente sem causar, no entanto, mortalidades nos animais que se tornaram tolerantes a este vírus (Kalagayan et al., 1991). Desde o ano 2000 há relatos que *L. vannamei* e *L. stylirostris* infectados com IHHNV adquirem uma maior resistência a infecções posteriores por WSSV, caracterizando assim uma interferência entre estas duas viroses (Tang et al., 2003). Estudos posteriores demonstraram ainda que certas linhagens de camarões, infectados previamente com IHHNV e posteriormente infectados com altas doses de WSSV, não desenvolviam a doença, no entanto poderiam apresentar o WSSV em baixas concentrações no organismo (Tang et al., 2003). Isto indicava, portanto, que a replicação do segundo vírus não conseguia evoluir suficientemente para tornar a infecção sistêmica e generalizada e, neste momento, ficou então caracterizado que uma infecção prévia em camarões com IHHNV poderia promover uma “resistência” a mortalidades advindas de infecções posteriores com WSSV.

De posse destas informações e com os dados obtidos em nosso estudo hipotetizou-se então, que os animais poderiam estar previamente infectados com IHHNV, uma vez que este vírus já tem sido relatado nos cultivos brasileiros e sem causar enfermidades, embora visualmente eles não apresentassem sinais clínicos da doença (Kalagayan et al., 1991). Uma PCR das amostras dos animais foi então realizada onde se comprovou, efetivamente, a presença de IHHNV (dados não apresentados), possivelmente de uma forma crônica, persistente e em baixa viremia. Este dado é relevante, pois pode auxiliar na elucidação do desaparecimento do WSSV no organismo dos animais 3 dias após a infecção, sendo que as explicações para isso seguem abaixo.

Os mecanismos pelo qual uma interferência viral confere esse tipo de resistência/tolerância em camarões não estão ainda claros, porém alguns autores acreditam que o IHHNV bloqueia a entrada do WSSV na célula-alvo por meio de uma *down-regulation* na produção do receptor viral ou depletando a produção de componentes do hospedeiro necessários à replicação do WSSV (Tang et al., 2003; Bonnichon et al., 2006). Alternativamente, e ainda mais provável que as hipóteses anteriores, seria a ativação de uma *resposta antiviral inespecífica* induzida por um sistema do tipo interferon-*like* (Liu et al., 2009) nos animais previamente infectados com IHHNV. Os interferons (IFNs) são proteínas do sistema imune dos mamíferos que *interferem* na replicação dos vírus na célula infectada, gerando um estado antiviral *inespecífico* no hospedeiro (Samuel, 2001). Embora em camarões não tenha sido encontrada, até o momento, nenhuma molécula/gene com homologia estrutural aos IFNs de mamíferos (Rosa e Barracco, 2008), existe na literatura vários relatos recentes que indicam a presença nestes animais de moléculas que lhes conferem uma defesa antiviral inespecífica, semelhante ao sistema interferon dos vertebrados (*vide* revisões Robalino et al., 2007 e Liu et al., 2009).

A primeira vez que um estado antiviral inespecífico foi demonstrado em invertebrados ocorreu em crustáceos, descrito por Robalino et al. (2004). Neste estudo, camarões *L. vannamei* injetados com um dsRNA de sequência inespecífica induziu a um aumento significativo na sua resistência contra infecções posteriores por dois outros vírus, não relacionados, o TSV e o WSSV (Robalino et

al., 2004), ou seja, fenômeno este muito semelhante ao estado antiviral produzido pelos IFNs dos mamíferos.

Sendo assim, poderíamos especular que a ausência de WSSV nos animais injetados em nosso estudo poderia estar intimamente relacionada à interferência viral pelo IHHNV. A presença prévia e persistente do IHHNV nos animais, poderia assim ter ativado um sistema interferon-like, que embora ainda não tenha sido identificado em peneídeos, há fortes indícios de existir, e isso geraria respostas antivirais inespecíficas contra uma infecção posterior por outro vírus, no caso o WSSV. Estas respostas antivirais poderiam então ter impedido a replicação do WSSV nos animais injetados e assim bloqueado a expansão da infecção. Um fato relevante e que deve ser considerado é que os animais foram injetados com uma *baixa carga viral* (0,35 DL₅₀) e isso provavelmente favoreceu temporalmente este processo. Segundo Tang et al. (2003) a resistência conferida pela interferência entre IHHNV e WSSV está relacionada ao grau de pré-infecção dos animais por IHHNV e à severidade do desafio posterior com WSSV, onde os benefícios desta interferência são maiores, em animais infectados com baixos níveis destes vírus. Além disso, um processo apoptótico precoce e eficiente das células infectadas deve ter sido concomitantemente acionado, o que levou à *clearance* viral do WSSV ainda nas primeiras 72 h após a injeção.

Embora todas essas hipóteses não tenham sido aqui testadas, elas merecem ser investigadas no futuro, não somente para esclarecer o ocorrido neste estudo, mas principalmente para auxiliar na compreensão dos mecanismos de defesa antiviral desencadeados pelos camarões. Fenômenos como a interferência viral e a *clearance* viral, recentemente documentados em camarões, mas ainda muito pouco compreendidos, podem fornecer informações valiosas neste sentido. Além disso, é de fundamental importância desenvolver estudos que visem compreender e esclarecer a existência de um sistema interferon-like nos crustáceos, que certamente revolucionará a compreensão do sistema imune destes animais e possivelmente auxiliará na criação de novos métodos para se combater o grande desafio atual da carcinicultura mundial, que são as viroses.

Em conclusão, os resultados encontrados neste estudo mostraram que os PS de *G. birdiae* não foram capazes de aumentar de maneira importante a imunocompetência de *L. vannamei* injetados com baixas doses de WSSV. Apesar disso, a alimentação dos animais com estes compostos aumentou significativamente a sua sobrevivência, o que sugere que estes PS atuem em outros processos fisiológicos não ligados diretamente ao sistema imune. Entretanto, o tratamento com esses PS, por 32 dias, propiciou a manutenção no número de hemócitos circulantes logo após a infecção viral dos animais, possivelmente através do aumento na produção de hemócitos pelo tecido hematopoiético. Além disso, estes compostos estiveram associados com um aumento tardio na atividade da PO e na capacidade hemaglutinante dos animais infectados, o que sugere uma estimulação parcial destes PS sobre a imunidade de *L. vannamei*. Todavia, os demais imunoparâmetros analisados não apresentaram uma modulação associada a estes compostos, nas condições utilizadas neste experimento. Estudos futuros, contudo, devem ser realizados para melhor esclarecer o mecanismo de atuação destes PS sobre o aumento da sobrevivência de camarões submetidos à infecção por WSSV. O fenômeno de interferência viral possivelmente ocorrido neste estudo, entre IHHNV e WSSV, deve ser igualmente investigado, não somente para elucidar as

causas do desaparecimento do vírus nos camarões infectados, mas também para auxiliar na compreensão das respostas antivirais desencadeadas por estes animais durante uma infecção por WSSV.

Acknowledgments

Os autores agradecem ao Giovani de Mello e aos funcionários da fazenda Yakult (Laboratório de Camarões Marinhos/UFSC) pelo fornecimento dos animais utilizados neste estudo. Agradecemos também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de mestrado a aluna Liege Cantelli e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP – Projeto 154/2007) pela concessão dos recursos destinados a aquisição de equipamentos e reagentes utilizados neste estudo.

5. Referências

- Ai, H.S., Huang, Y.C., Li, S.D., Weng, S.P., Yu, X.Q., He, J.G., 2008. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by WSSV. *Fish Shellfish Immunology* 25, 28–39.
- Anggraeni, M., Owens, L., 1998. Evidence for the haemocytic origin of lymphoid organ spheroids in *Penaeus monodon*. In: Flegel, T.W. (Ed.), *Advances in Shrimp Biotechnology*. Biotec, Bangkok, pp. 137.
- Armstrong, P.B., Melchior, R., Quigley J.P., 1996. Humoral Immunity in Long-lived Arthropods. *J. Insect Physiology*. 42, 53-64.
- Armstrong, P.B., 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in hostpathogen interaction. *Immunobiology* 211, 263-281.
- Aspán, A., Hall, M., Söderhäll, K., 1990. The effect of endogenous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. *Insect Biochemistry* 20, 485-492.
- Aspán, A., Söderhäll, K., 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activating by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochemistry* 21, 363-373.
- Beçak, W., Paulete, J. *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos. 1976, v. 1., 327p.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A., 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Current Opinion Immunol.* 12, 64-76.
- Bonami J-R. Shrimp Viruses. In: MAHY, B.W.J; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.), *Encyclopedia of Virology*, Oxford: Elsevier, 2008, p. 567-576.
- Bonnichon, V., Lightner, D.V., Bonami, J., 2006. Viral interference between infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus and white spot syndrome virus in *Litopenaeus vannamei*. *Diseases of Aquatic Organisms* 72, 179–184.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 249-254.

- Cadoret, J.P., Debo, R., Cornudella, L., Lardans, V., Morvan, A., Roch, P., Boulo, V., 1999. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. *FEBS Letters* 460, 81-85.
- Cerenius, L., Söderhäll, K., 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* 198, 116-126.
- Chang, P.S., Chen, H.C., Wang, Y.C., 1998. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. *Aquaculture* 164, 233-242.
- Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y., Liao, I.C., 2003. Dietary beta-1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 15, 297-310.
- Cheng, W., Liu, C-H., Tsai, C-H., Chen, J-C., 2005. Molecular cloning and characterisation of a pattern recognition molecule, lipopolysaccharide- and [beta]-1,3-glucan binding protein (LGBP) from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol.* 18, 297-310.
- Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K., Phohgdara, A., 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 233, 23-30.
- Costa, F.H.F., Farias, W.R.L., Sampaio, A.H., Rocha, I.R.C.B., Pontes, G.C., Silva, C.M., da Silva-Neto, J.F., da Silva, F.L.S., Nunes, E.V., de Souza, A.L.F., Lima-Junior, T.B. Enhancement of disease resistance against infectious myonecrosis virus (IMNV) of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* by sulfated polysaccharide extracts from the red seaweeds *Botryocladia occidentalis* and *Solieria filiformis*. FENACAM Feira Nacional do Camarão 21 a 24 de março de 2006 Natal-RN Apresentação de Trabalhos Técnicos e Sessão Especial. Pag. 25-32.
- Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H.J., 2008. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. *J. Fish Dis.* 31, 1-18.
- Fu, Y.W., Hou, W.Y., Yeh, S.T., Li, C.H., Chen, J.C., 2007. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 673-685.
- Gargioni, R., Barracco, M.A., 1998. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. *J. Morphol.* 236, 209-221.
- Gross, P.S., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W., 2001. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 565-577.
- Guertler, C. Estudo da produção intracelular de ânion superóxido pelos hemócitos dos camarões marinhos *Farfantepenaeus paulensis*, *Litopenaeus schmitti* e *L. vannamei*. 2007. 42f. Monografia (Graduação em Aqüicultura) – Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Hennig, O., Itami, T., Maeda, M., Kondo, M., Natsukari, Y., Takahashi, Y., 1998. Analyses of hemolymph immunoparameters in Kuruma shrimp infected with penaeid rodshaped DNA virus. *Fish Pathology* 33, 389-93.
- Hergenbahn, H.G., Hall, M., Söderhäll, K., 1988. Purification and characterization of an alpha2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The Biochem. J.* 255, 801-806.

- Hose, J.E., Martin, G.G., Gerard, A.S., 1990. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. *Biol. Bull.* 178, 33-45.
- Hou, W.Y., CHEN, J.C., 2005. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 127-138.
- Huang, X., Zhou, H.Q., Zhang, H., 2006. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharidae extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 750-757.
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B.L., Söderhäll, K., 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213-236.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture* 191, 45-52.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Söderhäll, K., 1994. Purification and cDNA cloning of a four-domains Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. *European Journal of Biochemistry.* 223, 389-394.
- Johansson, M.W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., Söderhäll, K., 2000. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture.* 191, 1-3, 45-52.
- Kalagayan, H., Godin, D., Kanne, R., Haging, G., Sweeney, J., Wyban, J., 1991. IHNV virus as an etiological factor in Runt-Deformity Syndrome (RDS) of juvenile *Penaeus vannamei* culture in Hawaii. *J World Aquacult Soc.* 22, 235-43.
- Leu, J., Wang, H., Kou, G., Lo, C., 2008. *Penaeus monodon* caspase is targeted by a white spot syndrome virus anti-apoptosis protein. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 476-486.
- Liang, Z., Söderhäll, K., 1995. Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology* 2, 385-391.
- Liang, Z., Sottrup-Jensen, L., Söderhäll, K., 1997. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 94, 6682-6687.
- Lightner, D.V., 1996 Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. *Rev. Sci. Technol.* 15, 579-601.
- Lightner, D.V. 2003. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHNV, WSSV, TSV and YHV. In: SAKAI, Y. MCVEY J.P.; JANG, D. MCVEY E; CAESAR (Eds.), *History in the Americas and Current Status, Japan: Proceedings of the US-Cooperative Program in Natural Resources (UJNR)*, p. 6-24.
- Lima, P. W. C. Efeito dos Polissacarídeos Sulfatados da alga marinha *Spatoglossum schroederi* sobre o aumento da resistência do camarão *Litopenaeus vannamei* submetido a situação de estresse. 2007. 99 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Lin, Y.C., Vaseeharan, B., Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, J.C., 2007. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Mol. Immunol.* 44, 1065-1074.
- Lin, Y.C., Vaseeharan, B., Ko, C.F., Chen, J.C., 2008. Molecular cloning and phylogenetic analysis on $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 317-329.
- Liu, H., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P., 2009. Antiviral immunity in crustaceans. *Fish Shellfish Immunol.* 1-10 (*in press*).
- Maldonado, M., Rodriguez, J., De Blas, I., 2003. Echeverria, F. Comportamiento hemocitario em familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. *CIVA 2003*, p. 891-899.

- 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.
- Meslin, F. X., Kaplan, M.M., Koprowski, H., 1996. Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, p. 476.
- Millar, D.A., Ratcliffe, N.A., 1994. Invertebrates. In: Turner, R.J. (Ed.), *Immunology: a comparative approach*. New York, pp. 30-66.
- Motesdeoca, M., Amano, Y., Echeverria, F., Betancourt, I., Panchana, F., Sotomayor, M., Rodriguez, J., 2001. La respuesta inmunitaria celular del Camarón *Litopenaeus vannamei* al WSSV y su utilidad en el control de la enfermedad en los estanques. *El Mundo Acuicola* 8, 38-42.
- Nunes, J.P.A., Martins, P.C., 2002. Avaliando o estado de saúde de camarões marinhos na engorda. *Panorama da Aquicultura*, 23-33.
- Oda, T., Akaike, T., Hamamoto, T., Suzuki, F., Hirano, T., Maeda, H., 1989. Oxygen radicals in influenza-induced pathogenesis and treatment with pyran polymerconjugated SOD. *Science* 244, 974–6.
- OIE World organisation for animal health. Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006. Disponível em <http://www.oie.int/eng/en_index.htm>. Acesso em 19/01/2009.
- Pais, R., Shekar, M., Karunasagar, I., 2007. Hemagglutinating activity and electrophoretic pattern of hemolymph serum proteins of *Penaeus monodon* and *Macrobrachium rosenbergii* to white spot syndrome virus injections. *Aquaculture* 270, 529–534.
- Pan, Z., He, J., Weng, S., Yin, Z., Fu, X., Li, S., 2008. Changes in mortality and immunological variables of *Litopenaeus vannamei* parents and their filial families infected with white spot syndrome under different experimental conditions. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 459-471.
- Rattanachai, A., Hirono, I., Ohira, T., Takahashi, Y., Aoki, T., 2004. Molecular cloning and expression analysis of alpha2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 599-611.
- Robalino, J., Browdy, C.L., Prior, S., Metz, A., Parnell, P., Gross, P., Warr, G., 2004. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. *J. Virol.* 78, 10442-10448.
- Robalino, J., Bartlett, T.C., Chapman, R.W., Gross, P.S., Browdy, C.L., Warr, G.W., 2007. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. *Dev. Comp. Immunol.* 31, 539-547.
- Rosa, R. D., Barracco, M. A., 2008. Shrimp interferon is rather a portion of the mitochondrial F0-ATP synthase than a true α -interferon. Short communication. *Molecular Immunology* 45, 3490–3493.
- Roulston, A., Marcellus, R.C., Branton, P.E., 1999. Viruses and apoptosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 53, 577-628.
- Roux, M.M., Pain, A., Klimper, K.R., Dhar, A.Y., 2002. The lipopolysaccharide and β -1,3-glucan binding protein gene is upregulated in white spot virus-infected shrimp (*Penaeus stylirostris*). *J. Virol.* 76, 7140-7149.
- Sahtout, A.H., Hassan, M.D., Shariff, M., 2001. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Dis. Aquat. Org.* 44, 155-159.

- Samuel, C.E., 2001. Antiviral actions of interferons. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 778-809.
- Sarathi, M., Nazeer-Basha, A., Ravi, M., Venkatesan, C., Senthil-Kumar, B., Sahul-Hameed, A.S., 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 222-230.
- Söderhäll, K., Häll, L., 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim. Biophys. Acta* 797, 99-104.
- Söderhäll, K., Cerenius, L., 1998 Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 23-28.
- Somprasong, N., Rimphanitchayakit, V., Tassanakajon, A., 2006. A fivedomain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 998-1008.
- Song, Y.L., Huang, C.C., 2000. Application of immunostimulants to prevent shrimp diseases. In: Fingerman, M., Nagabhushanam, R. (eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*. Science Publishers. pp. 173-188.
- Song, Y.L., Yu, C.I., Lien, T.W., Huan, C.C., Lin, M.N., 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. *Fish Shellfish Immunol.* 14, 317-331.
- Takahashi, Y., Itami, T., Maeda, M., Fujii, R., Tomonaga, S., Supamattaya, K., Boonyaratpalin, S., 1994. Electron microscopic evidence of bacilliform virus infection in kuruma shrimp *Penaeus japonicus*. *Fish Pathology* 29 (2), 121-125.
- Tang, K.F.J., Durand, S.V., White, B.L., Redman, R.M., Mohney, L.L., Lightner, DV., 2003. Induced resistance to white spot syndrome virus infection in *Penaeus stylirostris* through pre-infection with infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus a preliminary study. *Aquaculture* 216, 19-29.
- Tonganunt, M., Phongdara, A., Chotigeat, W., Fuji, K., 2005. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *J. Biotechnol.* 120, 135-145.
- Van de Braak, C.B., Botterblom, M.H.A., Taverne, N., Van Muiswinkel, W.B., Rombout, J.H.W.M., van der Knaap, W.P.W., 2002. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. *Fish Shellfish Immunol.* 13, 293-309.
- Vaseeharan, B., Lin, Y.C., Ko, C.F., Chiou, T.T., Chen, J.C., 2007. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing alpha2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 115-130.
- Wang, Y.T., Liu, W., Seah, J.N., Lam, C.S., Xiang, J.H., Korzh, V., 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Dis. Aquat. Org.* 52, 249-59.
- Wang, W., Zhang, X., 2008. Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 522-527.
- Warner, H.R., 1994. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radical Biology and Medicine* 3, 249-258.
- Wongprasert, K., Khanobdee, K., Glunukarn, S.S., Meeratana, P., Withyachumnarnkul, B., 2003. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. *Dis. Aquat. Org.* 55, 3-10.
- Yeh, F.C., Wu, S.H., Lai, C.Y., Lee, C.Y., 2006. Demonstration of nitric oxide synthase activity in crustacean hemocytes and anti-microbial activity of hemocyte-derived nitric oxide. *Comp. and Biochem. Physiol.* 144, 11-17.

Yeh, S., Chen, Y., Hsieh, S., Cheng, W., Liu, C., 2009. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 582-588.

Youngner, J.S., Whitaker-Dowling, P., 1999. Interference. In: Granoff A, Webster RG (eds) *Encyclopedia of virology*, 2nd edn. Academic Press, San Diego, CA, p 850–854

Zhan, W.B., Wang, H.Y., Fryer, J.L., Yu, K.K., Fukuda, H., Meng, Q.X., 1998. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. *J. Anim. Health* 10, 405-410.

Zhao, Z.Y., Yin, Z.X., Weng, S.P., Guan, H.J., Li, S.D., Xing, K., Chan, S.M., He, J.G., 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 520-534.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ANDERSON, R.S. Production of reactive oxygen intermediates by invertebrate hemocytes: immunological significance. In: SÖDERHÄLL, K., IWANAGA, S.; VASTA, G.R. (eds.). **New Directions in Invertebrate Immunology**. Fair Haven, SOS Publication. , 1996, p. 109-129.

AQUINO, R.S. et al. Occurrence of sulfated galactans in marine angiosperms: evolutionary implications. **Glycobiology**, v. 15, n.1, p. 11-20, 2005.

ARMSTRONG, P.B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in hostpathogen interaction. **Immunobiology**, v. 211, p. 263-281, 2006.

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

BABA, M. et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including Herpes Simplex Virus, Cytomegalovirus, Vesicular Stomatitis Virus, and Human Immunodeficiency Virus. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1742-1745, 1988.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 3-11, 2000.

BARBIERI, R.C.J; OSTRENSKY, A.N. **Camarões marinhos**: Engorda. 1. ed. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 352p.

BARRACCO, M.A; PERAZOLLO, L.M; ROSA, R.D. Inmunologia de crustáceos, con énfasis en camarones. In: VIELKA, M.Q; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), **Guía Práctica de Patología y inmunología de Camarones Penaeidos**, Ed. CYTED, 2008, pp. 169-224.

BERGER, C. Aportes de la bio-tecnología a la alimentación y a la inmunoestimulación de camarones peneidos. In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA. MEMORIAL DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA, 5., 2000, Yucatan. **Anais eletrônicos...** Yucatan:Merida, 2000. p.102-110. Disponível em: <www.educacion.uanl.mx/publicaciones/maricultura/acuiculturaV/berger.pdf>. Acesso em: 27 de janeiro de 2009.

BOGDAN, C; RÖLLINGHOFF, M; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 12, p. 64-76, 2000.

BOISSON-VIDAL, C. et al. Biological activities of polysaccharides from marine algae. **Drugs of the Future**, v. 20, n. 12, p. 1237- 1249, 1995.

BONAMI J-R. Shrimp Viruses. In: MAHY, B.W.J; VAN REGENMORTEL, M.H.V. (Eds.), **Encyclopedia of Virology**, Oxford: Elsevier, 2008, p. 567-576.

BOYD, C.E. **Water quality in warmwater fish ponds**. 3 ed. Alabama: Craftmaster Printers, 1979. 359 p.

CAMPA-CÓRDOVA, A.I; HERNÁNDEZ-SAAVEDRA, N.Y; ASCENCIO, F. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part C, v. 133, n. 4, p. 557-565, 2002.

CARTÉ, B.K. Biomedical potencial of marine natural products. **Bioscience**, v. 46, p. 271-286, 1996.

CÁSSARO, C.M.F; DIETRICH, C.P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 7, p. 2254-2261, 1977.

- CERENIUS, L; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 116-126, 2004.
- CHAMBERLAIN, G. O virus da síndrome da mancha branca. **Revista Panorama da Aquicultura**. Rio de Janeiro, v. 87, p. 43-49, 1999.
- CHANG, P.S; LO, C.F; WANG, Y.C; KOU, G.H. Identification of white spot syndrome virus associated baculovirus (WSBV) target organs in the shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 131-139, 1996.
- CHANG, P.S. et al. Detection of white spot syndrome associated baculovirus in experimentally infected wild shrimp, crabs and lobsters by in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 233-242, 1998.
- CHATTOPADHYAY, K. et al. Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 346-351, 2008.
- CHEN, L.L. et al. Transcriptional analysis of the DNA polymerase gene of shrimp white spot syndrome virus. **Virology**, v. 301, p. 136-147, 2002.
- CHOTIGEAT, W. et al. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 23-30, 2004.
- CHOU, H.Y. et al. Pathogenicity of a baculovirus infection causing White spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Taiwan. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 23, p. 165-173, 1995.
- DAMONTE, E.B; MATULEWICZ, M.C; CERESO, A.S. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agentes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2399-2419, 2004.
- DIEGUEZ-URIBEONDO, J; CERENIUS, J. The inhibition of extracellular proteinases from *Aphanomyces* spp by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycological Research**, v. 102, p. 821-824, 1998.
- DURAND, S. et al. Application of gene probes as diagnostic tools for white spot baculovirus (WSBV) of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 59-66, 1996.
- DURAND, S. et al. Ultrastructure and morphogenesis of white spot syndrome baculovirus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 29, p. 205-211, 1997.
- ESCOBEDO-BONILLA, C.M. et al. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1-18, 2008.
- FAO – **Fisheries and Aquaculture Department**, 2007. Aquaculture Newsletter, 36p.
- FLEGEL, T.W. Special topic review: major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 13, p. 433-442, 1997.
- FU, Y.W. et al. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 22, n. 6, p. 673- 685, 2007.
- FUHRMAN, J.A. Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. **Nature**, v. 399, p. 541-8, 1999.
- GARGIONI, R; BARRACCO, M.A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, p. 209-221, 1998.

- GROSS, P.S. et al. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, p. 565-577, 2001.
- GUIDOTTI, L.G; CHISARI, F.V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 65-91, 2001.
- HANNON, G.J. RNA interference. **Nature**, v. 418, p. 244-251, 2002.
- HERGENHAHN, H.G; HALL, M; SÖDERHÄLL, K. Purification and characterization of an alpha2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **The Biochemical Journal**, v. 255, p. 801-806, 1988.
- HIDARI, K.I.P.J. et al. Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 376, p. 91-95, 2008.
- HOSE, J.E; MARTIN, G.G; GERARD, A.S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. **Biological Bulletin**, v. 178, p. 33-45, 1990.
- HOU, W.Y; CHEN, J.C. The immunostimulatory effect of hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.19, n. 2, p.127-138, 2005.
- HUANG, X; ZHOU, H.Q; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharidae extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 5, p.750-757, 2006.
- IDEMA - Instituto de Desenvolvimento Econômico e Meio Ambiente do Rio Grande do Norte. Desenvolvimento Sustentável – RN Melhor para Carcinicultura. Ano I (1), 1-6, fev. 2006.
- IWANAGA, S; LEE, B.L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 128-150, 2005.
- JIMÉNEZ-VEGA, F; VARGAS-ALBORES, F. A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 29, p. 385-391, 2005.
- JIRAVANICHPAISAL, P; LEE, B.L; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213-236, 2006.
- JOHANSSON, M.W. et al. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 45-52, 2000.
- JOHANSSON, M.W; KEYSER, P; SÖDERHÄLL, K. Purification and cDNA cloning of a four-domains Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. **European Journal of Biochemistry**, v. 223, p. 389-394, 1994.
- KARUNASAGAR, I; OTTA, S.K; KARUNASAGAR, I. Histopathological and bacteriological study of white spot syndrome of *Penaeus monodon* along the west coast of India. **Aquaculture**, v. 153, n. 1-2, p. 9-13, 1997.
- KASORNCHANDRA, J; BOONYARATPALIN, S; ITAMI, T. Detection of white spot syndrome in cultured penaeid shrimp in Asia: microscopic observation and polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 243-251, 1998.
- KAWAI, T; AKIRA, S. Innate immune recognition of viral infection. **Nature Immunology**, v. 7, n. 2, p. 131-137, 2006.
- KHANOBDDEE, K. et al. Evidence for apoptosis correlated with mortality in the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with yellow head virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 48, n. 1-4, p. 79-90, 2002.

- KOU, G.T. et al, Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. In: FLEGEL T.W. I (Ed). **Advances in Shrimp Biotechnology National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**, Bangkok: Publicação, p. 267–271, 1998.
- KRÖNCKE, K.D; FEHSE, K; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric Oxide: cytotoxicity versus cytoprotection - how, why, when, and where? **Nitric Oxide**, v. 1, p. 107-120, 1997.
- LE MOULLAC, G; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v. 191, p. 121-131, 2000.
- LEE, S.Y; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002.
- LIANG, Z; SÖDERHÄLL, K. Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 2, p. 385-391, 1995.
- LIANG, Z; SOTTRUP-JENSEN, L; SÖDERHÄLL, K. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 94, p. 6682-6687, 1997.
- LIGHTNER, D.V. Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Review of Science and Technology**, v. 15, p. 579-601, 1996.
- LIGHTNER, D.V. et al. Experimental infection of western hemisphere penaeid shrimp with Asian white spot syndrome virus and Asian yellow head virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 10, p. 271–281, 1998.
- LIGHTNER, D.V. The Penaeid Shrimp Viral Pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV. In: SAKAI, Y. MCVEY J.P; JANG, D. MCVEY E; CAESAR (Eds.), **History in the Americas and Current Status**, Japan: Proceedings of the US-Cooperative Program in Natural Resources (UJNR), p. 6-24, 2003.
- LIN, Y.C. et al. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 1065-1074, 2007.
- LIN, Y.C. et al. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin (α 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 317–329, 2008.
- LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish & Shellfish Immunology**, p. 1–10, 2009 (*in press*).
- LO, C.F. et al. Detection of baculovirus associated with white spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimp using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 25, p. 133–141, 1996a.
- LO, C.F. et al. White spot syndrome baculovirus (WSBV) detected in cultured and captured shrimp, crabs and other arthropods. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 27, p. 215–225, 1996b.
- LO, C.F. et al. Detection and tissue tropism of White spot Baculovirus (WSBV) in captured brooders of *Penaeus monodon* with special emphasis on reproductive organs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 30, p. 53-72, 1997.
- LOH, P.C. et al. Viral pathogens of the penaeid shrimp. **Advances in Virus Research**, v. 48, p. 263–312, 1997.
- MARQUES, J. S. Contribuição para o monitoramento do vírus da Síndrome da Mancha Branca na carcinicultura de Santa Catarina. 2008. 51 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

- MARQUES, M.R.F; BARRACCO, M.A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 23-44, 2000.
- MATHEWS, M.B. Polyanionic proteoglycans. In: KLEINZELLER; SPRINGER, G.F; WITMANN, H.G. (Eds.), **Connective Tissue: Macromolecular Structure and Evolution**, Berlin: Springer-Verlag, p. 93-125, 1975.
- MAZUMDER, S. et al. Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (*Gracilariaceae*, Rhodophyta). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 31, p. 87-95, 2002.
- NAPPI, A.J; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioassays**, v. 22, p. 469-480, 2000.
- NAPPI, A.J; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, v. 6, p. 117-126, 1993.
- NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.
- OLIVEIRA, E.C; ALVEAL, K. The mariculture of *Gracilaria* (Rhodophyta) for the production of agar. In: AKATSUKA, I (ed.), **Introduction to Applied Phycology**, Local: SPB Academic Publishing, p. 553-564, 1990.
- OLIVEIRA, E.C; ALVEAL, K; ANDERSON, R.J. Mariculture of the agar-producing gracilarioid red algae. **Reviews in Fisheries Science**, v. 8, p. 345-377, 2000.
- OLIVEIRA, E.C; PLASTINO. E.M. Gracilariaceae. In: AKATSUKA, I (ed.), **Biology of economic algae**, Local: SPB Academic Publishing, p. 185-226, 1994.
- OTTA, S.K. et al. Polymerase chain reaction (PCR) detection of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured and wild crustaceans in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 38, p. 67-70, 1999.
- OSTRENSKY, A. Estudos para viabilização dos cultivos comerciais de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil. 1997. 235 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) –Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.
- PAINTER, T.J. Algal polysaccharides. In: **The Polysaccharides**, New York: Academic Press, 195p, 1983.
- PERCIVAL, E; MACDOWELL, R.H. **Chemistry and Enzymology of Marine Algal Polysaccharides**. New York: Academic Press, 219p, 1967.
- PÉREZ-FARFANTE, J; KENSLE, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns on the world. In: **Key of diagnoses for the families and genera**, Paris: Éditions du Museum National d'Histoire Naturelle, 1997, 233p.
- PLASTINO, E.M; OLIVEIRA, E.C. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta), a new espécie from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. **Phycologia**, v. 41, n. 4, p. 389-396, 2002.
- RAJEDRAN, K.V. et al. Experimental host range and histopathology of white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp, prawns, crayfish and lobsters from India. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 183-191, 1999.
- RATTANACHAI, A. et al. Molecular cloning and expression analysis of alpha2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 16, n. 5, p. 599-611, 2004.

ROBALINO, J. et al. Induction of antiviral immunity by double-stranded RNA in a marine invertebrate. **Journal of Virology**, v. 78, p. 10442-10448, 2004.

ROBALINO, J. et al. Double-stranded RNA induces sequence-specific antiviral silencing in addition to nonspecific immunity in a marine shrimp: convergence of RNA interference and innate immunity in the invertebrate antiviral response? **Journal of Virology**, v. 79, p. 13561-13571, 2005.

ROBALINO, J. et al. Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 539-547, 2007.

RODRIGUES, J.A.G. Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) – Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

ROSA, R. D; BARRACCO, M. A. Shrimp interferon is rather a portion of the mitochondrial F0-ATP synthase than a true α -interferon. Short communication. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 3490–3493, 2008.

ROULSTON, A; MARCELLUS, R.C; BRANTON, P.E. Viruses and apoptosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 577-628, 1999.

SAHTOUT, A.H; HASSAN, M.D; SHARIFF, M. DNA fragmentation, an indicator of apoptosis, in cultured black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 44, p. 155-159, 2001.

SMITH, V.J; BROWN, J.H; HAUTON, C. Immunostimulation in crustaceans: does it really protect against infection? **Fish & Shellfish Immunology**, v.15, n.1, p.71-90, 2003.

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

SOMPRASONG, N; RIMPHANITCHAYAKIT, V; TASSANAKAJON, A. A fivedomain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 998-1008, 2006.

TAVARES, E.C.B; SANTOS, M.A.S. Estudo exploratório da cadeia produtiva da carcinicultura no estado do Pará: o caso do *Litopenaeus vannamei*. *Amazônia Ciência e Desenvolvimento.*, ed. 2, v. 1, n. 2, 2006. p. 85-96. Disponível em: < http://www.bancoamazonia.com.br/bancoamazonia2/Revista/cienciaedesenvolvimento_02/Amazonia_Ciencia_Desenvolvimento_8596.pdf > Acesso em: 29 de jan de 2009.

TIRASOPHON, W; ROSHORM, Y; PANYIM, S. Silencing of yellow head virus replication in penaeid shrimp cells by dsRNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, p. 102–107, 2005.

TONGANUNT, M. et al. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 135-145, 2005.

Van de BRAAK, C.B. et al. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *Vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, n. 4, p. 293-309, 2002.

Van de VELDE, F; PEREIRA, L; ROLLEMA, H.S. The revised NMR chemical shift data of carrageenans. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 2309–2313, 2004.

Van HULTEN, M.C.W. et al. The white spot syndrome virus DNA genome sequence. **Virology**, v. 286, p. 7–22, 2001.

- VASEEHARAN, B. et al. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing alpha2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, n. 1-2, p. 115-130, 2007.
- WANG, Y.G. et al. Histopathology and cytopathology of white spot syndrome virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, p. 1–11, 1999a.
- WANG, Q. et al. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of white spot syndrome virus. **Aquaculture**, v. 170, n. 3-4, p. 179–194, 1999b.
- WANG, Q; POULOS, B.T; LIGHTNER, D.V. Protein analysis of geographic isolates of shrimp white spot syndrome virus. **Archives of Virology**, v. 145, p. 263–274, 2000.
- WANG, Y.T. et al. White spot syndrome virus (WSSV) infects specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 249–59, 2002.
- WARNER, H.R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 3, p. 249-258, 1994.
- WASIELESKY, W. J. Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: Efeitos de parâmetros ambientais e manejo de cultivo. 2000, 199 f.. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2000.
- WITVROUW, M; DE CLERCQ, E. Sulfated Polysaccharides Extracted from Sea Algae as Potential Antiviral Drugs. **Gen Pharmacol**, v. 29, n. 4, p. 497-511, 1997.
- WITVROUW, M; PANNECOUQUE, C; DE CLERCQ, E. In Carbohydrates in Drug Desing; Z.J. Witzcak and K.A. Nieforth, Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1997, 449p.
- WONGPRASERT, K. et al. Time-course and levels of apoptosis in various tissues of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 55, p. 3-10, 2003.
- YANG, F. et al. Complete genome sequence of the shrimp white spot bacilliform virus. **Journal of Virology**, v. 75, p. 11811–11820, 2001.
- YEH, S.T; LEE, C.S; CHEN, J.C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 3, p. 332-345, 2006.
- YODMUANG, S. et al. YHV protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, p. 351–356, 2006.
- ZHAN, W.B. et al. White spot syndrome virus infection of cultured shrimp in China. **Journal of Animal Health**, v. 10, p. 405-410, 1998.