

Suscetibilidade do camarão-branco do Pacífico à infecção com *Vibrio alginolyticus* em diferentes saturações de oxigênio

Mauricio Lehmann¹, Delano Dias Schleder², Adolfo Jatobá³, Luciane Maria Perazzolo⁴, Luis Vinatea⁵

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a mortalidade acumulativa, a contagem total de hemócitos (CTH) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com *Vibrio alginolyticus* e submetidos a diferentes saturações de oxigênio dissolvido. Para tanto, 240 camarões (10 ± 1,5g) foram distribuídos em 16 caixas plásticas (60L), divididos em quatro grupos, infectados e não infectados, submetidos a 30% ou 100% de saturação (em quadruplicata). Foram coletadas amostras de hemolinfa para avaliação da CTH e das EROs antes (0h) e depois (24h, 48h e 72h) da infecção, e estimada a mortalidade nesse período. Foi observada mortalidade apenas nos tratamentos com infecção, sendo maior com 30% de saturação (97,2%) do que 100% (77,8%), porém não foram constatadas diferenças significativas na CTH e nas EROs dos animais infectados e não infectados em ambas as saturações. Dessa forma, pode-se concluir que a hipóxia aumenta a susceptibilidade dos camarões à infecção bacteriana, porém, aparentemente, sem relação com a modulação da quantidade de hemócitos circulantes e do *burst* respiratório.

Termos para indexação: *Litopenaeus vannamei*; saturação de oxigênio; infecção bacteriana.

Susceptibility of Pacific white shrimp to *Vibrio alginolyticus* infection under different oxygen saturations

Abstract – The present study aimed to evaluate the cumulative mortality, reactive oxygen species production (ROS) and total hemocyte counts (THC) of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Vibrio alginolyticus* at different oxygen saturations. A total of 240 shrimp (10 ± 1.5g) were distributed into 16 tanks (60L), divided into two groups, infected and uninfected, which were subjected to 30 or 100% of saturation (in quadruplicate). During 72 hours after infection, daily hemolymph samples were collected for THC and ROS evaluation, and dead animals were removed and computed to assess cumulative mortality rates. Mortality was observed only in infected group, and was higher under 30% of saturation (97.2%) than 100% (77.8%), however, no significant differences were observed between THC and ROS production of infected and uninfected animals, under both saturations. Therefore, the results of this study suggested that hypoxia increases the susceptibility of the shrimps to vibrio infection, which may be not related to the modulation of THC and ROS production.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*; dissolved oxygen saturation; bacterial infection.

Introdução

Na carcinicultura, a ocorrência de parâmetros inadequados de qualidade de água pode levar à alteração da homeostase dos animais a ponto de aumentar sua suscetibilidade a doenças. Entre elas estão as vibrioses, que podem ser consideradas doenças primárias, como o caso da síndrome da zoea II e, mais recentemente, da síndrome da mortali-

dade precoce (EMS, *early mortality syndrome*), causadas respectivamente por *Vibrio harveyi* e *V. parahaemolyticus*, ou doenças secundárias ou oportunistas, quando acometem camarões em condições de estresse, causando mortalidades expressivas (LE MOULLAC & HAFNER, 2000; MORALES-COVARRUBIAS, 2008; LI et al., 2010; TRAN et al., 2013).

Os camarões não apresentam uma imunidade adaptativa. Isso significa que

seu sistema imunológico não possui capacidade de memória e especificidade aos patógenos, porém são munidos de um sistema imune inato eficiente e capaz de protegê-los contra a invasão de agentes patogênicos. Apesar da grande variação dos valores de referência, a avaliação dos parâmetros hematológicos de camarões marinhos submetidos a situações de estresse e infecções pode fornecer informações sobre ►

Recebido em 29/8/2014. Aceito para publicação em 18/5/2015.

¹ Médico-veterinário, Dr., pesquisador do Núcleo de Pesquisa em Pesca e Aquicultura (Nupa Sul-1) do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA), BR-280, Km 27, 89245-000 Araquari, SC, e-mail: lehmann@ifc-araquari.edu.br.

² Biólogo, M.Sc., pesquisador do Nupa Sul-1 do IFCCA, e-mail: delano.schleider@ifc-araquari.edu.br.

³ Engenheiro de aquicultura, Dr., pesquisador do Nupa Sul-1 do IFCCA, e-mail: adolfo.jatoba@ifc-araquari.edu.br.

⁴ Bióloga, Dra., pesquisadora do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 88040-900 Florianópolis, SC, e-mail: luciane@ccb.ufsc.br.

⁵ Biólogo, Dr., pesquisador do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da UFSC, Beco dos Coroas, 503, 88061-600 Florianópolis, SC, e-mail: vinatea@mbox1.ufsc.br.

as condições de saúde desses animais (BARRACO et al., 2008).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a mortalidade acumulativa, a contagem total de hemócitos (CTH) e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* infectado experimentalmente com *Vibrio alginolyticus* e submetido a diferentes saturações de oxigênio dissolvido.

Material e métodos

Material biológico

Foram utilizados 240 camarões *L. vannamei* ($10,0 \pm 1,5g$) provenientes de uma linhagem livre dos patógenos específicos (SPF, do inglês *specific pathogen free*) de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), oriundos da Aquatec Ltda. e cultivados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram transportados até o Laboratório de Bioensaios do Instituto Federal Catarinense – *campus* Araquari, permanecendo em aclimação por um período de 48h a 23°C, em água esterilizada (UV), com 33‰ de salinidade, aeração constante e sem receber alimentação.

Condições experimentais

Os camarões foram distribuídos em 16 caixas plásticas de 60L (15 animais por caixa) divididas casualmente, em esquema fatorial 2 x 2: fator 1, saturação de oxigênio, (100% ou 30%); fator 2, infecção (injetados com solução salina ou *V. alginolyticus*), totalizando quatro tratamentos em quadruplicata. O sistema de controle de oxigenação foi composto por duas redes de fornecimento de gases. Uma rede fornecia ar pressurizado (soprador de 0,25CV), e outra distribuía gás nitrogênio apenas nas caixas submetidas a 30% de saturação, ambas dotadas de um conjunto de mangueiras com controle individual de fluxo.

A saturação de 30% foi alcançada

pelo borbulhamento de nitrogênio e pelo consumo de oxigênio pelos animais, e a manutenção desse nível de saturação foi obtida pela regulagem do fluxo de ar (4 vezes ao dia) e pela manutenção de uma lâmina de EVA (etileno vinil acetato) sobre a água, que restringiu as trocas gasosas com a atmosfera. A temperatura e o pH foram mensurados diariamente.

Preparação do inóculo experimental de *Vibrio alginolyticus*

A cepa selecionada de *V. alginolyticus* foi inoculada em meio de cultura caldo de coração e cérebro (BHI) com 3% de NaCl e incubada a 30°C por 18h. Após o crescimento, a cultura foi diluída em série (1:10) até a diluição 10^{-8} e semeada em ágar tripton de soja (TSA) suplementado com 3% de NaCl para contagem total de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC ml^{-1}) do inóculo. Este foi diluído serialmente em BHI (1:2) em triplicata nas microplacas de 96 poços até o 12º poço, e a absorbância medida em leitor de microplaca (630nm) para confecção da curva de crescimento (concentração bacteriana x absorbância). Para a confecção do inóculo experimental, a cepa foi cultivada em BHI (18h a 30°C), centrifugada por 20min a 1.800 x *g*. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril 2% (SSE) na concentração de $1,2 \times 10^5$ UFC ml^{-1} de *V. alginolyticus*.

Desafio experimental e avaliação dos parâmetros hematoimunológicos

Após a aclimação, os animais foram mantidos por 24h nas condições experimentais e, então, foram injetados (agulha 13 x 4,5mm) 50µl de inóculo experimental ou SSE 2% (tratamentos sem infecção) no músculo abdominal entre o primeiro e o segundo segmento na região dorsal dos animais. A coleta de hemolinfa foi realizada antes da infecção (0h) e a cada 24h por três dias, utilizando seringa refrigerada com anti-

coagulante MAS (336mM NaCl, 115mM glicose, 27mM citrato de sódio, 9mM EDTA, pH 7,2) (1:3 v/v). Uma alíquota de 30µl foi adicionada em solução de anti-coagulante com 4% de formol para CTH, a qual foi determinada em câmara de Neubauer. O restante foi utilizado para a produção de EROs, a qual foi quantificada pelo método de redução do NBT, utilizando laminarina (2mg ml^{-1}) como indutor, conforme descrito por Guertler et al. (2010).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de homocedasticidade de Levene e, em seguida, à Anova com medidas repetidas no tempo ($\alpha = 5\%$).

Resultados e discussão

Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na produção de EROs entre os tratamentos 100% e 30% de saturação (Tabela 1). Similarmente, Le Moullac & Haffner (2000) e Fridovich (2004) constataram que o *burst* respiratório consome um percentual muito pequeno do oxigênio e, portanto, não é afetado pela condição de hipóxia. Os animais infectados apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) aos não infectados (Tabela 1). A modulação da produção de EROs em diferentes espécies após a infecção com *Vibrio* sp. é bastante controversa. Alguns trabalhos apontam redução na produção de EROs pelas células imunocompetentes entre 4 e 120h (SEPULCRE et al., 2007; LI et al., 2010), enquanto outros têm observado um incremento na produção desses compostos em um período de tempo similar (de 2 a 192h) (LABREUCHE et al., 2006; TANGUY et al., 2012). Labreuche et al. (2006) sugerem que a alta produção de EROs pode causar citotoxicidade nos hemócitos, o que permitiria aos vibrios sobrepujar as defesas celulares, facilitando, dessa forma, o crescimento bacteriano e a disseminação no hospedeiro.

Tabela 1. Produção de espécies reativas a oxigênio expressa pela absorbância da redução do NBT por ânions superóxido em hemócitos de camarões *L. vannamei* submetidos a duas saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com *V. alginolyticus*⁽¹⁾

Tratamento	Tempo (h)			
	0	24	48	72
100%	0,110 ± 0,025	0,163 ± 0,090	0,194 ± 0,026	0,147 ± 0,034
100% + vibrio	0,110 ± 0,025	0,210 ± 0,049 ⁽¹⁾	0,195 ± 0,031 ⁽¹⁾	0,212 ± 0,038 ⁽¹⁾
30%	0,120 ± 0,034	0,111 ± 0,019	0,180 ± 0,060	0,139 ± 0,017
30% + vibrio	0,120 ± 0,034	0,183 ± 0,048 ⁽¹⁾	0,221 ± 0,069 ⁽¹⁾	0,199 ± 0,049* ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Indica diferença significativa nos valores de produção de EROs dos animais infectados em relação aos não infectados nos diferentes tempos e saturações de oxigênio pelo teste F ($p < 0,05$).

Em relação à CTH, não foi observada redução significativa ($p < 0,05$) em condição de hipóxia, diferente do relatado por Le Moullac & Haffner (2000) e Cheng et al. (2002) em condição de hipóxia severa ($\sim 1\text{mg ml}^{-1}$). De fato, a CTH apresentou comportamento similar entre as diferentes saturações e queda no número de células circulantes 24h após a infecção, voltando a elevar-se após 48h (Tabela 2). A queda na CTH observada em 24h pode ser resultado da migração dos hemócitos, importantes na defesa contra microrganismos através da fagocitose e na formação de nódulos no local da infecção (BARRACCO et al., 2008). O mesmo foi observado por Cheng et al. (2002) ao avaliar a variação na CTH do *Macrobachium rosenbergii* em condições de hipóxia e desafiados com *Enterococcus*. Labreuche et al. (2006) também observaram aumento na CTH após 72 horas de infecção com *V. aestuarinus* em ostra. Com isso, sugeriram que essa elevação nos hemócitos circulantes poderia ser devida ao recrutamento de novos hemócitos formados nos órgãos hematopoiéticos ou à mobilização deles dos tecidos para a hemolinfa circulante. Não foram encontradas

diferenças significativas em relação ao tempo de infecção nem interação entre os fatores saturação, infecção e tempo, tanto para os valores de CTH quanto para os de produção de EROs.

A mortalidade acumulativa foi maior entre os camarões submetidos a 30% de saturação (97,2%) do que no tratamento com 100% (77,8%) (Figura 1). Não foi constatada mortalidade nos tratamentos sem infecção. Esses resultados demonstram a importância do

oxigênio dissolvido para a manutenção dos mecanismos de defesa do organismo, pois a hipóxia aumentou a suscetibilidade dos camarões à infecção com *V. alginolyticus*, que, no entanto, pode estar associada a outros mecanismos de defesa não avaliados no presente trabalho, como as atividades fagocítica e antibacteriana e da enzima lisozima, conforme demonstrado por Le Moullac & Haffner (2000), Cheng et al. (2002) e Li et al. (2006).▶

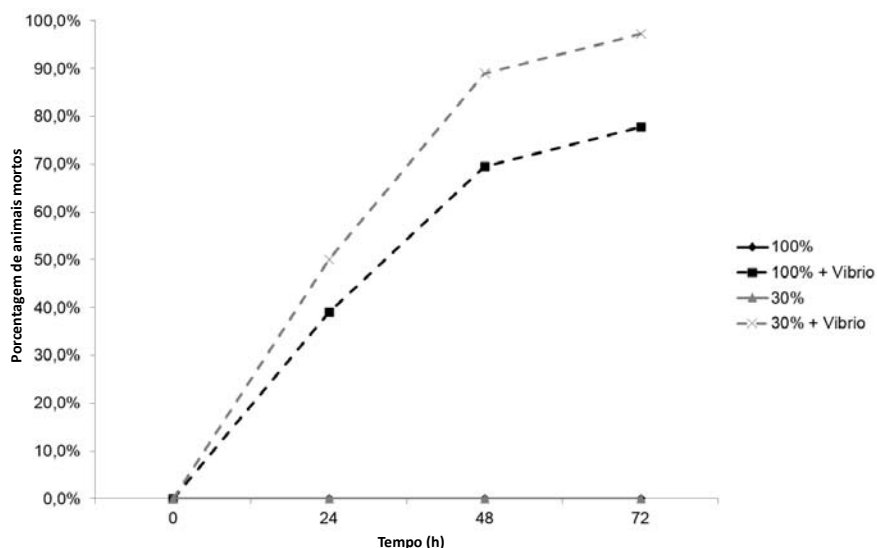


Figura 1. Mortalidade acumulativa de camarões *L. vannamei* submetidos a duas saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com *V. alginolyticus*.

Tabela 2. Contagem total de hemócitos⁽¹⁾ em camarões *L. vannamei* submetidos a duas saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com *V. alginolyticus*⁽²⁾

Tratamento	Tempo (h)			
	0	24	48	72
100%	143,4 ± 19,3	171,8 ± 46,7	155,2 ± 62,1	199,8 ± 56,2
100% + vibrio	143,4 ± 19,3	77,8 ± 6,1 ⁽²⁾	60,3 ± 9,3 ⁽²⁾	108,7 ± 41,3 ⁽²⁾
30%	139,8 ± 10,2	170,0 ± 85,2	151,5 ± 39,4	175,3 ± 42,7
30% + vibrio	139,8 ± 10,2	66,3 ± 17,6 ⁽²⁾	82,8 ± 12,7 ⁽²⁾	162,0 ± 19,7 ⁽²⁾

⁽¹⁾ Número de células x 10^5 ml^{-1} .

⁽²⁾ Indica diferença significativa nos valores de produção de EROs dos animais infectados em relação aos não infectados nos diferentes tempos e saturações de oxigênio pelo teste F ($p < 0,05$).

Conclusão

A hipóxia aumentou a suscetibilidade dos camarões à infecção com *V. alginolyticus*, porém, aparentemente, não há relação com a modulação da quantidade de hemócitos circulantes e do *burst* respiratório.

Referências

- BARRACCO, M.A.; PERAZZOLO, L.M.; ROSA, R.D. Inmunología del camarón. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL J. (Eds.) **Guía técnica – patología e inmunología de camarones penaeídeos**. Panamá: New Concept Publications, 2008. p.161-224.
- CHENG, W.; LIU, C.H.; HSU, J.P. et al. Effect of hypoxia on the immune response of giant prawn *Macrobachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. **Fish Shellfish Immun.**, v.13, p.351-356, 2002.
- FRIDOVICH, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? **Aging Cell**, v.3, p.13-16, 2004.
- GUERTLER, C.; SCHLEDER, D.D.; BARRACCO, M.A. et al. Comparative study of the intracellular superoxide anion production in different penaeid species through the NBT-reduction assay. **Aquac Res**, v.41, p.1082-1088, 2010.
- LABREUCHE, Y.; LAMBERT, C.; SOUDANT, P. et al. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, following bacterial infection with *Vibrio aestuarianus* strain 01/32. **Microbes Infect**, v.8, p.2715-2724, 2006.
- LE MOULLAC, G.; HAFFNER, P. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, v.191, p.121-131, 2000.
- LI, Y.; LI, J.; WANG, Q. The effects of dissolved oxygen concentration and stocking density on growth and non-specific immunity factors in Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v.256, p.608-616, 2006.
- LI, C.C.; LI, S.T.; CHEN, J.C. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. **Fish Shellfish Immun.**, v.28, p.121-127, 2010.
- MORALES-COVARRUBIAS, M.S. Enfermedades bacterianas. In: MORALES, V.; CUÉLLAR-ANJEL J. (Eds.) **Guía técnica – patología e inmunología de camarones penaeídeos**. Panamá: New Concept Publications, 2008. p.116-134.
- SEPULCRE, M.P.; SARROPOULOU, E.; KOTOULAS, G. et al. *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. **Mol Immunol**, v.44, p.3751-3757, 2007.
- TANGUY, M.; MCKENNA, P.; GAUTHIER-CLERC, S. et al. Functional and molecular responses in *Mytilus edulis* hemocytes exposed to bacteria *Vibrio splendidus*. **Dev Comp Immunol**, v.29, p.419-429, 2013.
- TRAN, L.; NUNAN, L.; REDMAN, R.M. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Dis. Aquat. Org.** v.105, p.45-55, 2013. ■

Não deixe sua consciência escorrer pelo ralo:
preserve a água e evite o desperdício.

