



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Influência da saturação de oxigênio sobre a imunidade do camarão branco do Pacífico sob desafio viral e bacteriano.

Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina

Orientador: Luis Alejandro Vinatea, Arana
Co-orientadora: Luciane Maria. Perazzolo

Mauricio Lehmann

Florianópolis
2012

Catlogação na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

L523i Lehmann, Maurício

Influência da saturação de oxigênio sobre a imunidade do camarão branco do Pacífico sob desafio viral e bacteriano [tese] / Mauricio Lehmann ; orientador, Luis Alejandro Vinatea, Arana. - Florianópolis, SC, 2012.

1 v.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. I. Vinatea Arana, Luis. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Influência da saturação de oxigênio sobre a imunidade do camarão
branco do pacífico sob desafio viral e bacteriano**

Por

MAURÍCIO LEHMANN

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

DOUTOR EM AQUICULTURA

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

Prof. Evoy Zaniboni Filho, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana – *Orientador*

Dr. Alfredo Olivera Gálvez

Dr. Felipe do Nascimento Vieira

Dr. José Luiz Pedreira Mouriño

Dr. Pedro Carlos Cunha Martins

À minha família: Anelise, Luccas e Nicollas.

AGRADECIMENTOS:

A todos os amigos pela compreensão, incentivo e apoio.

Aos meus colegas de instituição Robert e Jonas pelos conselhos e pela solidariedade.

Ao Delano e Adolfo pela ajuda impressionante, apoio, incentivo e cobrança.

A Cristiane Guertler, mente brilhante, pela disposição, ajuda e sacrifício.

Ao Bruno pela ajuda com a estatística.

Ao Felipe Vieira pela amizade e enorme ajuda no momento mais importante.

Ao professor Walter Seifert pelas palavras certas nos momentos certos.

A todos os colaboradores do LCM pela gentileza e dedicação em apoiar os experimentos.

Ao Jairo da Fazenda Yakult, meu ex-aluno, pelo apoio e solidariedade.

Ao laboratório da UNIVALE pelo apoio com o fornecimento de água filtrada e esterilizada.

Ao Carlito sempre disponível, atencioso e disposto a solucionar problemas.

A minha co-orientadora professora Luciane pelas recomendações, disposição e atenção.

Ao meu orientador, professor Vinatea, pela oportunidade.

"O aspecto mais triste da vida de hoje é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria".

Isaac Asimov

RESUMO:

O objetivo deste trabalho foi verificar se saturações de 30, 60 e 100% de oxigênio dissolvido exercem influência sobre a sobrevivência e sobre os parâmetros imunológicos, contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei*, sob desafio do vírus da mancha branca e da bactéria *Vibrio alginolyticus*. A infecção ocorreu por inoculação direta na musculatura. Os desafios experimentais tiveram duração de 96 horas com vírus e 72 horas com a bactéria e os parâmetros imunológicos foram avaliados a cada 24 horas. Houve uma menor mortalidade no grupo de animais com 100% de saturação de oxigênio no desafio com vírus e uma maior mortalidade na saturação de 30% de oxigênio para o *V. alginolyticus*. Não foram encontradas diferenças entre os três níveis de oxigênio dissolvido durante o período experimental, tanto para a bactéria como para o vírus, nos parâmetros imunológicos. O grupo de animais não infectados não apresentou mortalidade e os parâmetros imunológicos permaneceram estáveis.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, vírus da mancha branca, *Vibrio alginolyticus*

ABSTRACT:

The objective of this study was to determine whether saturation of 30, 60 and 100% of oxygen influence on survival and on the immunological parameters total hemocyte count and reactive oxygen species in shrimp *Litopenaeus vannamei* under challenge with white spot syndrome virus and *Vibrio alginolyticus*. The infection occurred by direct inoculation in the musculature. Experimental challenge lasted 96 hours for virus and 72 hours for bacteria and the immune parameters were evaluated every 24 hours. There was a lower mortality in the group of animals with 100% of oxygen saturation in virus challenge and a high mortality in the 30% saturation group of bacteria. No difference was found between the three levels of dissolved oxygen during the trial period for both the bacteria and for the virus in immunological parameters. The animals without challenge, the immunological parameters still stable.

Keyword: *Litopenaeus vannamei*, White spot, *Vibrio alginolyticus*.

LISTA DE FIGURAS:

- Figura 1: Número acumulado de camarões *L. vannamei*, encontrados mortos durante do experimento, submetidos a três saturações de oxigênio e inoculados com o vírus da mancha branca. 35
- Figura 2: Número acumulado de camarões *L. vannamei* encontrados mortos durante do experimento, submetidos a três saturações de oxigênio e inoculados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* em diferentes tempos. 49

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Contagem total de hemócitos (células x 10 ⁶ /ml) em camarões marinhos da espécie <i>L. vannamei</i> submetidos a três diferentes saturações de oxigênio dissolvidos e desafiados com vírus da mancha branca.....	35
Tabela 2: Produção de ânions peróxido em células de camarões marinhos da espécie <i>L. vannamei</i> submetidos a três saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com o vírus da mancha branca expressa pela absorvância da redução do NBT <i>in vitro</i>	36
Tabela 3: Contagem total de hemócitos (células x 10 ⁶ /ml) em camarões marinhos da espécie <i>L. vannamei</i> submetidos a três diferentes saturações de oxigênio dissolvidos e desafiados com a bactéria <i>Vibrio alginolyticus</i>	50
Tabela 4: Produção de ânions peróxido em células de camarões marinhos da espécie <i>L. vannamei</i> submetidos a três saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com a bactéria <i>Vibrio alginolyticus</i> em diferentes tempos expressa pela absorvância da redução do NBT <i>in vitro</i>	50

SUMARIO:

INTRODUÇÃO	21
O VÍRUS DA MANCHA BRANCA.....	21
VIBRIOSES	23
RESPOSTA IMUNOLÓGICA	23
JUSTIFICATIVA.....	26
OBJETIVOS:	27
Objetivo Geral	27
Objetivo Específico.....	27
FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	27
Estado imunitário de camarões brancos do Pacífico mantidos sobre diferentes saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com virus da mancha branca.....	29
ABSTRACT:.....	30
RESUMO:	30
INTRODUÇÃO:	31
MATERIAL E METODOS	32
Material Biológico:	32
Inóculo Experimental:	32
Condições Experimentais:	32
Desafio Experimental:.....	33
Análises Imunológicas	33
Análise Estatística:	34
RESULTADOS	34
DISCUSSÃO.....	36
CONCLUSÃO:	38
REFERÊNCIAS	38
Estado imunitário de camarões brancos do Pacífico mantidos sobre diferentes saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com <i>Vibrio alginolyticus</i>	43
ABSTRACT.....	44
RESUMO	44
INTRODUÇÃO	45

MATERIAL E METODOS	45
Material Biológico	46
Inóculo Experimental.....	46
Condições Experimentais.....	47
Desafio Experimental.....	47
Coleta de Material.....	48
Análise estatística.....	48
RESULTADOS.....	48
DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO:	51
REFERENCIAS:.....	52
CONCLUSÕES GERAIS:.....	56
CONSIDERAÇÕES FINAIS:.....	57
REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO:	58
ANEXO I: Sistema de Distribuição Dos Gases A Cada Uma Dos Aquários.....	64
ANEXO II: Disposição Da Lâmina De EVA Sobre A Lamina De Água.....	65
ANEXO III: Alteração Da Musculatura Dos Camarões Nos Locais De Inoculação.	66

INTRODUÇÃO

O pescado é hoje a commodity mais comercializada no mundo e tem a China como maior produtora. Os mercados consumidores de maior importância são Estados Unidos e a União Europeia (FAO, 2010).

A produção mundial de crustáceos em 2009 foi de 5.304.592 de toneladas com um valor estimado em US\$ 24.133.781.000, sendo inferior apenas para a produção de peixes de água doce. Os principais produtores americanos, Equador, Brasil, Honduras e México, geram 20% da produção mundial de crustáceos sendo que 95% são baseadas no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, seguido pelo *Litopenaeus stylirostris* (FAO, 2010; LIGHTNER, 2011).

A produção do camarão branco se dá em viveiros cujo ambiente de cultivo sofre alterações físicas e químicas no decorrer do ciclo de produção (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). As concentrações de amônia e de matéria orgânica vão se intensificando, principalmente pelo aporte de alimentos (FUNGE-SMITH; BRIGGS, 1998; JIANG et al., 2004). Os fatores físicos, como a temperatura da água, podem retardar e diminuir a mortalidade de camarões inoculados com o vírus da mancha branca (RAHMAN et al., 2006) assim como a expressão gênica de células subcuticulares em camarões infectados com o vírus da mancha branca (REYES et al., 2007).

As alterações bruscas de salinidade promovem um aumento na mortalidade de animais infectados além de alterações do quadro hemocítico em animais da espécie *Fenneropenaeus chinensis* (LIU et al., 2006). Alterações no pH afetam a sensibilidade a hipóxia ambientais ácidos tornam os animais mais sensíveis que ambientes alcalinos (ZHANG et al., 2006).

Alterações na concentração de oxigênio, hipóxia, promovem alteração comportamental em camarões (DEAN; RICHARDSON, 1999; ZHANG et al., 2006).

As alterações fisiológicas dos animais interferem na sua interação com o ambiente. Animais de maior peso ou ainda em privação de alimentos aumentam sua sensibilidade a hipóxia (ZHANG et al., 2006).

O Vírus da Mancha Branca

Até o final dos anos 1980 as viroses marinhas não eram consideradas importantes do ponto de vista ecológico. Estudos recentes encontraram milhares de formas virais num mililitro de água, sendo hoje

aceita como a “forma de vida” mais abundante nos oceanos (SUTTLE, 2007). A globalização do comércio, o uso de lastros em navios e as facilidades de transporte internacional aceleraram a distribuição de micro-organismos pelos continentes (SAULNIER et al., 2000a).

O desenvolvimento de uma patologia é o resultado da interação entre o animal, o ambiente e o patógeno. Assim, a simples presença de um agente patogênico não se traduz em doença (SNIESZKO, apud LIGHTNER; REDMAN, 1998). Um ambiente adequado pode diminuir o risco de doenças oportunistas e a suscetibilidade do animal ao agente infeccioso (FUNGE-SMITH; BRIGGS, 1998). Os crustáceos podem ser afetados por vários tipos de patógenos como bactérias, fungos e vírus (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Entre os vírus patogênicos para camarões peneídeos, o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês “*White Spot Syndrome Virus*”) se destaca. Este vírus possui rápida replicação, podendo causar 100% de mortalidade nos cultivos, é apontado como um dos maiores flagelos para indústria da carcinicultura mundial (ESCOBETO-BONILHA et al., 2008; LIGHTNER, 2011).

Diagnosticado pela primeira vez em 1992, em Taiwan, o vírus emergiu no Japão em 1993, distribuindo-se pelos países asiáticos (NUNAN et al., 1998; SANCHEZ-PAZ, 2010). O primeiro diagnóstico no continente americano ocorreu em uma fazenda de camarões no sul do Texas em 1995. A suspeita da forma de introdução na América recai sobre a importação de camarões congelados para consumo, ou vivos, sob a forma de náuplios, para aquicultura, originários da Ásia (HASSON et al., 2006). Em 1999 esta patologia alcançou a América do Sul quando surgiram mortalidades massivas no Equador (GALAVIZ-SILVA et al., 2004).

O Brasil permaneceu livre da doença até 2004 quando surgiram os primeiros casos em Santa Catarina com o relato oficial junto a OIE (Organização Internacional de Epizootias) em janeiro de 2005.

O vírus causador da mancha branca é um vírus envelopado de dupla fita de DNA circular, tendo formato de bacilo do gênero *Whispovirus*, pertencente à família Nimaviridae (ESCOBETO-BONILLA et al., 2008). A extrema mortalidade e morbidade atingem vários decápodes como caranguejos, lagostins e camarões (LO et al., 1996). A forma de infecção pode ocorrer de forma horizontal com o contato de animais contaminados, vivos ou mortos, ou ainda no sentido vertical dos reprodutores para seus descendentes (SANCHEZ-PAZ, 2010).

Vibrioses

As infecções bacterianas, principalmente os víbrios, são consideradas como agentes oportunistas, localizando-se preferencialmente no trato digestivo, brânquias e cutícula (MORALES-COVARRUBIAS, 2008). As bactérias oportunistas utilizam-se de situações de estresse do animal para desenvolver infecções como as hepatopancreáticas e necróticas em larviculturas ou engordas (VANDENBERGHE et al., 1999; MORALES-COVARRUBIAS, 2008). Os principais relatos de mortalidade ocorrem nas larviculturas e berçários de camarões (SAUNIER et al., 2000a). Por outro lado, o *Vibrio penaeicida* já demonstrou ser virulento para juvenis e para adultos da espécie *L. stylirostris* e para o *Penaeus japonicus* (SAULNIER et al., 2000b). O *Vibrio alginolyticus*, dependendo da cepa, pode atuar como um patógeno oportunista em crustáceos (SAULNIER et al., 2000a; LIU et al., 2004) e peixes marinhos como o *Sparus aurata* (BALEBONA et al., 1998).

Resposta imunológica

A prevenção das doenças dos camarões percorre o mesmo caminho adotado em animais terrestres e seres humanos, com o monitoramento de infecções e a avaliação do estado imunológico dos prováveis hospedeiros. O estabelecimento de padrões para os índices de saúde para os crustáceos permitiria que as deficiências imunológicas e consequentemente vulnerabilidade às doenças pudessem ser detectadas, contribuindo assim para o controle de patologias (BACHÉRE et al., 2000).

Os vertebrados possuem respostas imunes que incluem tanto reações de defesa inatas quanto adaptativas, resultando num sistema de defesa completo que lhes confere memória imunológica através da produção de anticorpos antígeno-específicos. Esta característica permite o desenvolvimento de vacinas e, consequentemente, o desenvolvimento de uma medicina veterinária preventiva. Animais invertebrados como o camarão são dotados apenas do sistema imune inato, sua memória imunológica é inexistente, ocorrendo apenas o reconhecimento imediato do não próprio (BARRACO, 2004).

Apesar de não ser tão eficiente como o sistema adaptativo, o sistema inato demonstrou ser eficaz, permitindo aos invertebrados colonizarem espaços e ecossistemas com alta densidade de microrganismos, o que lhes garantiu a sobrevivência ao longo da sua

evolução. O conjunto de defesa dos invertebrados apresenta ainda uma cutícula rígida como barreira física na manutenção de sua integridade (BARRACO et al., 2008).

O fato dos invertebrados contarem apenas com a imunidade inata significa dizer que seu organismo não está apto a produzir anticorpos antígeno-específicos e que não possui, portanto, uma memória imunológica em longo prazo. Em outras palavras, a confecção de vacinas, da forma como a concebemos hoje, é inviável (BARRACO et al., 2008).

O sistema imune (inato) dos invertebrados, incluindo os crustáceos, está relacionado ao seu sangue ou hemolinfa, que é composta por uma fração celular (hemócitos) e uma fração líquida (plasma), onde estão dissolvidos os fatores humorais. Os hemócitos e os fatores humorais atuam em sinergismo para proteger estes animais contra invasões e infecções por patógenos, garantindo assim sua sobrevivência (BARRACO et al., 2008).

Os invertebrados contam com diversos mecanismos de defesa, entre eles: coagulação da hemolinfa, melanização mediada pelo sistema pró-fenoloxidase (proPO), sistema complemento mediado por lectinas, aglutinação celular mediada por lectinas, sistemas antibacterianos, antifúngicos e antivirais mediados por peptídeos, por receptores *Toll-like* ou por proteínas de reconhecimento padrão, além da produção de espécies reativas de oxigênio e sistema fagocítico (IWANAGA; LEE, 2005).

As respostas celulares incluem a fagocitose de microrganismos, a formação de nódulos e cápsulas em torno de partículas estranhas e a cicatrização de ferimentos (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; BARRACO et al., 2008). Dentre os fatores humorais destacam-se as moléculas de reconhecimento padrão, como a proteína que se ligam aos lipopolissacarídeos (LPS, LBP), proteínas que se ligam a β -1,3-glicanas (β GBP), proteínas que se ligam a ambos LPS e a β -1,3-glicanas (LGBP), lectinas, o sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO), o sistema de coagulação (BARRACO, 2004; JIRAVANICHPAISAL et al., 2006) e a hemocianina (ZHANG et al., 2004; LEI et al., 2008).

Os hemócitos são as células imunocompetentes responsáveis pelas respostas celulares dos crustáceos. Estas células respondem à invasão de microrganismos e parasitas, destruindo-os por fagocitose ou isolando-os em agregados hemocíticos através da formação de nódulos e cápsulas (vide revisão de MILLAR; RETCLIFFE, 1994). Os mecanismos de lise e morte dos patógenos são ainda auxiliados pela atuação de moléculas microbicidas e/ou citotóxicas, excitadas pelos

hemócitos no sítio de infecção, ou resultantes da clivagem proteolítica de proteínas de sistemas de defesa adjacentes (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; BARRACO, 2004).

Após a detecção dos invasores, os hemócitos migram para o local da infecção gerando uma reação inflamatória. A partir desta reação inicia-se o processo de fagocitose dos microrganismos formando-se camadas celulares com a forma de nódulos ou cápsulas ao redor destas partículas com a possível liberação de moléculas microbicidas e ou citotóxicas para a degradação dos invasores (BARRACO, 2004).

Existem dúvidas ainda em relação à função das células presentes na hemolinfa. Enquanto alguns autores defendem a participação dos hemócitos hialinos (HH) (SÖDERHÄLL et al., 1986; JOHANSON et al., 2000; MUÑOZ et al., 2000), outros encontraram serem os hemócitos com grânulos grandes e pequenos (HGP e HGG) responsáveis por este processo (PERAZOLLO, 1994; GARGIONE; BARRACO, 1998).

Nos crustáceos, a fagocitose de partículas estranhas é feita tanto pelos hemócitos circulantes quanto por hemócitos infiltrados nos tecidos (JOHNSON, 1987), sendo que o reconhecimento e a citoaderência dos hemócitos à partícula pode ocorrer diretamente, através de ligações aos receptores de membrana do fagócito, ou indiretamente, mediadas por moléculas de reconhecimento padrão dissolvidas do plasma (MILLAR; RATCLIFE, 1994). Após a fagocitose do elemento considerado não-próprio, aparece em vesículas semelhantes à fagolisossomos, sendo em seguida, degradados pelas enzimas presentes nestas vesículas (RATCLIFE et al., 1985).

É durante a fagocitose, quando os microrganismos são englobados pelos hemócitos, que se observa um importante aumento no consumo intracelular de oxigênio, conhecido por *burst* respiratório, onde ocorre a produção e a liberação de substâncias com elevado poder microbicida e citotóxico (SONG; HSIEH, 1994; BOGDAN et al., 2000; CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002), que auxiliam na morte e degradação do agente invasor. Estas substâncias incluem espécies altamente reativas de oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), íons hidroxila (OH^-), oxigênio “*singlet*” (1O_2), entre outras, sendo que o ânion superóxido é a primeira substância a ser formada neste processo (CHANG et al., 2006). Além destas, outras moléculas citotóxicas e microbicidas são produzidas e/ou liberadas pelos hemócitos, como as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e os peptídeos antimicrobianos (PAMs)(BARRACO, 2004).

As espécies reativas de oxigênio (EROs), são moléculas extremamente reativas que dispõem de elétrons livres em suas camadas

mais externas, reagindo com compostos que estejam próximos como membranas e proteínas. Desta forma tornam-se eficientes agentes microbicidas e também citotóxicos, características que afetam o agente infeccioso (ANDERSON, 1996; ROCH, 1999).

O complexo enzimático de membrana denominado NADPH oxidase é o responsável pela produção dos radicais livres, presente na membrana plasmática e lisossomal e que catalisam a redução do oxigênio molecular a ânion superóxido (O_2^-) (ANDERSON, 1996). A partir do ânion superóxido pode surgir espontaneamente ou por ação da enzima superóxido desmutase (SOD) o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este composto, altamente reativo e citotóxico, deve ser desmutado pelas catalases para que não se difunda livremente pelo citoplasma, podendo atingir o meio extra-celular danificando os tecidos do hospedeiro (WARNER, 1994).

Para prevenir estes possíveis danos, as células do hospedeiro possuem três mecanismos de neutralização destes radicais. O primeiro envolve compostos antioxidantes de baixo peso molecular como o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione e α -tocoferol (vitamina E), que podem interagir diretamente com as EROs neutralizando-as (WARNER, 1994). As outras duas estratégias de defesa envolvem uma variedade de enzimas que podem tanto metabolizar as EROs, quanto reparar os danos causados a ácidos nucleicos, lipídios e proteínas da célula hospedeira (enzimas de reparo de DNA, proteases, lipases) (WARNER, 1994). Os antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, vitamina E e o β -caroteno, são de origem exógena, necessitando assim serem absorvidos através da alimentação (ANDERSON, 1996).

A avaliação *in vitro* da produção de ânion superóxido pelos fagócitos é usualmente feita através do método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*), que tem sido considerado um método preciso, rápido e relativamente barato para mensurar o efeito de substâncias potencialmente imunoestimulantes e o estresse oxidativo em vários organismos, incluindo os de interesse aquícola (SONG; HSIEH, 1994; MUÑOZ et al., 2000; CAMPA-CÓRDOVA et al., 2002). Além disso, a quantificação de ânions superóxido é comumente utilizada para avaliar o *status* imunológico e as condições de saúde de camarões e moluscos cultivados (BARRACO et al., 2008).

JUSTIFICATIVA

O ataque provocado por patógenos, principalmente vírus, nas fazendas de camarão marinho tem dizimado produções e cadeias

produtivas. Em Santa Catarina, desde o surgimento da doença em 2004, a produção nunca mais se reergueu restando hoje apenas algumas fazendas. A busca por instrumentos de controle da doença tem sido o objetivo de muitos pesquisadores e o conhecimento do comportamento do animal em situações de estresse é uma delas.

OBJETIVOS:

Objetivo geral

Contribuir para o entendimento da dinâmica de fatores ambientais e patologias, através da interação entre a variável saturação de oxigênio dissolvido e infecções por patógeno viral e bacteriano, contribuir para o desenvolvimento de uma ferramenta eficaz na avaliação do estado imunitário do camarão *L. vannamei*.

Objetivo específico

- a) Avaliar a influência da saturação de oxigênio dissolvido sobre a sobrevivência, contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio de camarões marinhos da espécie *L. vannamei* inoculados com o vírus da mancha branca (WSSV).
- b) Avaliar a influência da saturação de oxigênio dissolvido sobre a sobrevivência, contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio de camarões marinhos da espécie *L. vannamei* inoculado com a bactéria *Vibrio alginolyticus*

FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese está dividida em três capítulos. O primeiro referente a introdução e revisão de literatura e os demais correspondem cada um a um artigo. O segundo e terceiro capítulos estão formatados de acordo com as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”.

CAPITULO 2

**ESTADO IMUNITÁRIO DE CAMARÕES BRANCOS DO
PACÍFICO MANTIDOS SOBRE DIFERENTES SATURAÇÕES
DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E DESAFIADOS COM VÍRUS DA
MANCHA BRANCA.**

Mauricio Lehmann, Cristiane Guertler, Delano D. Schleder, Luciane
Perazzolo, Luis Vinatea

Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Pesquisa
Veterinária Brasileira”

ABSTRACT:

This study aimed to investigate the influence of some levels of oxygen saturation on survival, total count of hemocytes and reactive oxygen species in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with white spot virus. During 96 hours the hemolymph were collected daily from the animals inoculated with the virus, maintained in aquaria with 30, 60 and 100% of oxygen saturation. The cumulative mortality of the animals challenge with the White spot virus was inversely proportional to the saturation of dissolved oxygen. However, the oxygen saturation did not affect the total count of hemocytes and reactive oxygen species (ROIS) of the shrimp. Thus the decrease in oxygen saturation to 30% appears to increase the susceptibility of the shrimp to the White spot virus, however without presenting a significant influence on the total count of hemocytes and evaluation of reactive oxygen species.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, WSSV, total hemocytes count, oxygen reactive species

RESUMO:

O presente estudo teve por finalidade verificar a influência de diferentes níveis de saturação de oxigênio sobre a sobrevivência, a contagem total de hemócitos e as espécies reativas de oxigênio em camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* infectados com vírus da mancha branca. Durante 96 horas foram realizadas coletas diárias de hemolinfa de animais inoculados com vírus, mantidos em aquários com 30, 60 e 100% de saturação de oxigênio. A mortalidade cumulativa dos animais desafiados com vírus da mancha branca foi inversamente proporcional à saturação de oxigênio dissolvido. A saturação de oxigênio não afetou a contagem total de hemócitos nem as espécies reativas de oxigênio dos camarões. A queda na saturação de oxigênio até 30% aumenta a suscetibilidade dos camarões ao vírus da mancha branca, contudo sem apresentar influência significativa sobre os parâmetros imunológicos.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, WSSV, Contagem total de hemócitos, espécies reativas de oxigênio.

INTRODUÇÃO:

A doença de qualquer organismo é o resultado da interação entre patógeno, ambiente e hospedeiro (Lightner & Redman, 1998). A alteração dos parâmetros de qualidade de água de um viveiro de produção de camarões peneídeos predispõe a situações estressantes, a ponto de aumentar a suscetibilidade dos animais à doença (Le Moullac & Haffner, 2000; Mercier et al., 2006; Peinado-Guevara & Lopez Meyer, 2006).

Experimentos com variações de parâmetros de qualidade de água em infecções com o vírus da mancha branca foram conduzidos por vários pesquisadores. Vidal et al. (2001) testaram a sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* infectados em diferentes temperaturas e obteve 92,5% de sobrevivência com em temperaturas de 37°C a 40°C. Rahman et al. (2006) apontam que a temperatura mais efetiva para diminuir a infectividade do vírus foi de 33°C. Jiravanichpaisal et al. (2004) avaliaram o efeito deste parâmetro em *Pacifastacus leniusculus* e encontraram que temperaturas mais baixas diminuem a infectividade do vírus. Por outro lado, Liu et al. (2006) verificaram que a mortalidade aumenta com a diminuição da salinidade em *Feneropenaeus chinensis*.

O oxigênio tem destacada importância como fator na qualidade de água. O efeito de saturações inferiores a 100% sobre a fisiologia tem sido avaliado por pesquisadores em várias espécies de crustáceos. Jiang et al. (2005) avaliaram o efeito agudo da hipóxia em *L. vannamei*, e afirmam que em 48 horas a fenoloxidase intensificou sua atividade enquanto a contagem total de hemócitos diminuiu apenas com 3,5 mg de oxigênio por litro. O camarão *Litopenaeus stylirostris* submetido à hipóxia foi objeto de estudo no período de muda para Mugnier e Soyez (2005) e para Le Moullac et al. (1998) em relação a sua suscetibilidade a vibrioses. A susceptibilidade ao *Enterococcus*, em hipóxia, foi avaliada por Cheng et al. (2002) em relação ao *Macrobachium rosenbergii*. Zhang et al. (2006) avaliaram a variação da tolerância à hipóxia (DO 50) do camarão *L. vannamei* sob diferentes temperaturas, salinidades, intensidades de luz, pesos corporais e índices de pH denotando a possibilidade de inúmeras interações entre estes fatores.

O presente estudo teve por finalidade verificar a influência de três níveis de saturação de oxigênio tem sobre os parâmetros imunológicos, contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio em camarões marinhos da espécie *Litopenaeus vannamei* infectados com vírus da mancha branca.

MATERIAL E METODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, Santa Catarina, Brasil em 2009 e 2010.

Material biológico:

Foram utilizados 360 animais de 20 ± 2 g, da espécie *Litopenaeus vannamei*, provenientes de linhagem livre dos patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias (OIE), oriundos da Genearch Aquacultura LTDA (Praia de Pititinga, Rio Grande do Norte) e cultivados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes animais foram transportados por via rodoviária até o Laboratório de Bioensaios do IFC, permanecendo em aclimação por um período de 48 horas com temperatura de 23°C, 35‰ de salinidade, aeração e sem receber alimentação durante todo o período experimental (Pascual et al., 2006).

Inóculo experimental:

O material infectante teve origem em amostras recolhidas de fazendas de produção de camarões localizadas da região Norte e Sul do estado de Santa Catarina, durante o surto de 2004/2005 e armazenadas a -17°C. As amostras contaminadas e não contaminadas foram trituradas mecanicamente e homogeneizadas em solução tampão (NaCl 330 mM, Tris a 10 mM, pH 7,4) (1:10 p/v) sendo centrifugado a 2000 x g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi centrifugado a 9000 x g por 10 minutos a 4°C, filtrado (0,45 µm) e conservado em nitrogênio líquido (Prior et al., 2003). O inóculo contaminado, que teve origem nas fazendas, foi injetado em animais sadios (livres de WSSV e IMNV). Aos primeiros sinais de doença os animais foram sacrificados para se obter o inóculo experimental com a mesma metodologia relatada. A presença do vírus da mancha branca foi confirmada em nível molecular por PCR utilizando-se do protocolo recomendado pela OIE (organização Internacional de Epizootias).

Condições experimentais:

O experimento foi conduzido em dois grupos, um contaminado e outro não, com quatro repetições para cada tratamento (30, 60 e 100%

de saturação de oxigênio), utilizando 24 caixas plásticas com tampa e capacidade de 60 litros. A água com 35‰ de salinidade foi filtrada e esterilizada por radiação ultravioleta. Foram abrigados 15 animais por caixa respeitando uma ocupação máxima de um animal para quatro litros de água (Le Moullac et al., 1998; Jiang et al., 2005).

O sistema de controle de aeração foi composto por duas redes de fornecimento de gases. Uma rede forneceu ar pressurizado por um soprador de 0,25 cv, distribuído por um conjunto de mangueiras para as 24 caixas com controle individual de fluxo junto a cada uma (ANEXO I). Uma segunda rede distribuiu nitrogênio para as caixas onde o nível de saturação do oxigênio proposto era de 30% e 60%. O nível de saturação desejado foi alcançado pelo borbulhamento de nitrogênio (Jiang et al., 2005) até próximo a saturação requerida, e pelo consumo dos animais (Le Moullac et al., 1998; Mugnier & Soyez, 2005). A manutenção da saturação de oxigênio foi obtida pelo fluxo de ar controlado e pela manutenção de uma lâmina de EVA (etileno vinil acetato)(ANEXO II) sobre a água. A lâmina restringiu as trocas gasosas com a atmosfera pela diminuição interface ar água. Após a aclimação de 48 horas no laboratório, os animais permaneceram por mais 24 horas nas três saturações experimentais. A avaliação do nível de oxigênio dissolvido foi realizada com três medições diárias utilizando-se um oxímetro modelo 550A fabricado pela empresa YSI.

Após este período um grupo de animais foi inoculado com material contaminado com vírus da mancha branca e o outro foi inoculado com material não contaminado. A coleta de hemolinfa para análise da contagem total de hemócitos (THC) e avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi realizada a cada 24h as 8:30h.

Foram retirados os animais mortos e computados para avaliar a sobrevivência cumulativa por tratamento.

Desafio experimental:

Cada animal recebeu uma dose de 50µl de solução (agulha 13X4,5) no músculo abdominal entre o primeiro e segundo segmento dorsal, tendo-se o cuidado de desviar a linha central evitando-se danificar qualquer estrutura delicada como o cordão neural.

Análises imunológicas

As amostras foram obtidas em pools de três animais por caixa por tratamento. A coleta foi realizada em seringa refrigerada com

anticoagulante MAS (336mM NaCl, 115mM glicose, 27 mM de citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) na proporção de 1:2, sendo a diluição final em 1:3. A coleta foi realizada na região entre o último esternito cefalotorácico e primeiro abdominal com seringa de 1 ml acoplada a agulha 13X4,5. Um alíquota de 30µl foi separada em uma solução de anticoagulante com 4% de formol (formol MAS) para contagem de células.

A contagem de células foi realizada com a utilização de uma câmara de Neubauer. A produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos hemócitos foi quantificada pelo método de redução do NBT (*nitro-blue-tetrazolium*), um corante redox amarelado solúvel, que durante a fagocitose é capturado para dentro do vacúolo fagocítico juntamente com a partícula endocitada (adaptado de Song & Hsieh, 1994; Perazzolo et al., 2002). O NBT é quimicamente reduzido pelos ânions superóxido a formazan, que é um composto insolúvel de coloração azul-púrpura, que pode ser visualizado diretamente ao microscópio ou solubilizado pelo DMSO (dimetil sulfóxido) e quantificado espectrofotometricamente a uma absorbância de 630 nm.

Análise Estatística:

Os dados foram submetidos à análise de variância com parcelas subdivididas no tempo ($\alpha < 0,05$). Uma vez encontrada diferenças entre as médias, foi utilizado o teste de Tukey para separação de médias ($\alpha < 0,05$) (Zar, 1984).

RESULTADOS

No dia subsequente a inoculação com o vírus da mancha branca os animais desenvolveram uma evidente opacidade da musculatura indicando uma reação inflamatória no local da aplicação (Anexo III). Após 72h, alguns camarões apresentavam-se letárgicos, deixando-se capturar ou deitados de lado no fundo da caixa, independente da saturação de oxigênio. Os animais que morreram não apresentaram manchas brancas no exoesqueleto, características da patologia.

A mortalidade cumulativa foi superior nos tratamentos em que os camarões foram submetidos às menores saturações de oxigênio dissolvido (Figura 1).

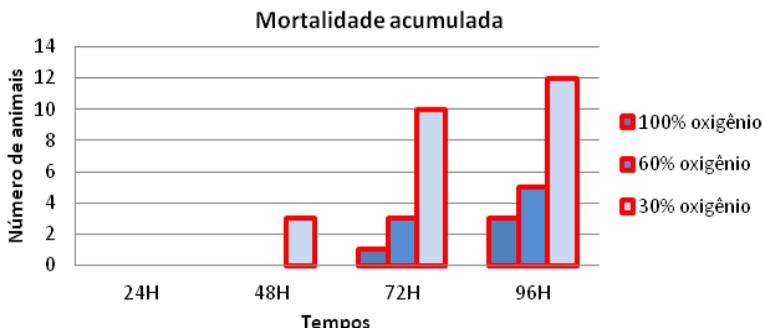


Figura 1: Número acumulado de camarões *L. vannamei*, encontrados mortos durante o experimento, submetidos a três saturações de oxigênio e inoculados com o vírus da mancha branca.

Os camarões não infectados apresentaram uma leve elevação no número de células na avaliação da coleta de 24 horas com retorno aos níveis normais na avaliação seguinte, sem apresentar diferença entre os tratamentos com valores oscilando entre 15×10^6 e 20×10^6 . Não foi observada diferença significativa na contagem de hemócitos dos camarões infectados entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados ($p \geq 0,05$). A contagem total de hemócitos apresentou uma queda a partir de 48 horas até o final do experimento (Tabela 1).

Tabela 1: Contagem total de hemócitos em camarões marinhos da espécie *L. vannamei* submetidos a três diferentes saturações de oxigênio dissolvidos e desafiados com vírus da mancha branca.

Saturação de oxigênio	Contagem Total de Hemócitos (células $\times 10^6 \text{ ml}^{-1}$)				
	Horas				
	0	24	48	72	96
100%	21,38± $2,90 \times 10^6$	21,41± $7,71 \times 10^6$	4,39± $1,01 \times 10^6$	5,48± $2,34 \times 10^6$	2,46± $0,98 \times 10^6$
60%	20,00± $1,00 \times 10^6$	27,90± $11,93 \times 10^6$	8,38± $1,54 \times 10^6$	7,97± $2,31 \times 10^6$	2,15± $1,06 \times 10^6$
30%	20,98± $2,75 \times 10^6$	21,13± $12,16 \times 10^6$	10,83± $2,06 \times 10^6$	5,31± $2,20 \times 10^6$	3,08± $1,21 \times 10^6$

A avaliação das espécies reativas de oxigênio nos animais não infectados apresentou-se estável durante todo o experimento. As espécies reativas de oxigênio dos animais infectados não apresentaram

diferença significativa em relação aos tratamentos em nenhum dos tempos avaliados ($p \geq 0,05$). Contudo, foi observada diferença ao longo do tempo com um pico de produção de ânions peróxido entre 24 e 48 horas (Tabela 2).

Tabela 2: Produção de ânions peróxido em células de camarões marinhos da espécie *L. vannamei* submetidos a três saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com o vírus da mancha branca expressa pela absorvância da redução do NBT *in vitro*.

Saturação de oxigênio	Produção de ânions superóxido (absorvância 630nm)				
	Horas				
	0	24	48	72	96
100%	0,180 $\pm 0,025$	0,535 $\pm 0,151$	0,662 $\pm 0,146$	0,471 $\pm 0,011$	0,586 $\pm 0,111$
60%	0,365 $\pm 0,164$	0,539 $\pm 0,137$	0,594 $\pm 0,059$	0,353 $\pm 0,055$	0,317 $\pm 0,052$
30%	0,224 $\pm 0,043$	0,624 $\pm 0,129$	0,568 $\pm 0,142$	0,337 $\pm 0,066$	0,327 $\pm 0,108$

DISCUSSÃO

Os animais apresentaram letargia e morte sem a presença das manchas brancas características a exemplo dos achados de Mathew et al. em 2007. O índice de mortalidade dos animais durante o experimento apresentou uma elevada diferença quando relacionado à saturação do oxigênio dissolvido. A mortalidade ocorrida nos animais com 100% de saturação de oxigênio foi 25% daquela encontrada nos animais com 30% de saturação, apontando para influência deste parâmetro sobre a sobrevivência do camarão em resposta ao desafio experimental. Ruiz-Velazco et al. (2010), em avaliação da influência dinâmica do vírus da mancha branca em fazendas mexicanas, afirmam que o aumento da aeração em pequenos ambientes diminui o impacto da síndrome da mancha branca.

Os sinais inflamatórios encontrados nos animais no local de aplicação são conhecidos e relatados por Barraco et al. (2008) e Sarathi et al. (2007).

As saturações de oxigênio aplicadas neste experimento não demonstraram influência significativa sobre a contagem total de hemócitos ou sobre a produção de ânions peróxido.

Jiang et al. (2005) constataram queda na contagem total de hemócitos, em camarões da espécie *Penaeus stylirostris* quando submetidos a concentrações de oxigênio de 3,5 e de 2 mg l⁻¹ após 24 horas porém sem diferença estatística. Le Moullac et al. (1998) realizaram um experimento com severa hipóxia de 1mg/l de saturação de oxigênio por 24 horas e afirmam que houve cerca de 30% de diferença na mortalidade, no entanto esclarecem que o resultado pode ser devido ao número reduzido de animais por tratamento, apenas 10 animais.

Mugnier e Soyez (2005) afirmam que o efeito da hipóxia parece diminuir ao longo do tempo para o camarão *P. stylirostris* sugerindo que o animal consegue se adaptar aos baixos níveis de oxigênio. Dean e Richardson (1999) fazem a mesma afirmação em relação a um camarão de água doce *Paratya curvirostris*.

A diminuição na contagem de hemócitos, que foi constatada no experimento, é um achado comum em animais infectados pelo vírus da mancha branca em várias espécies de crustáceos (Jiravanichpaisal et al., 2006; Sarathi et al., 2007). Wang et al. (2002) afirmam que esta redução na contagem se deve principalmente a diminuição dos hemócitos de grânulos grandes e dos hemócitos de grânulos pequenos, principais alvos do vírus da mancha branca.

Zenteno-Savín et al. (2006) utilizaram a hipóxia em um experimento com 24 horas de duração com *L. vannamei* para avaliação das espécies reativas de oxigênio em hipóxia, afirmando que não houve diferença significativa com a normóxia, concluíram ainda que os valores críticos de oxigênio ficaram entre 0,9 a 2 mg/l para animais entre 10 e 15g, muito abaixo das saturações utilizadas neste trabalho. Segundo Le Moullac e Haffner (2000) e Le Moullac et al. (1998) a atividade da célula não se altera perante a hipóxia, incluindo a NADPH oxidase, responsável pela produção de íons peróxido (EROs). Fridovich (2004) afirma que o percentual de consumo de oxigênio para espécies reativas é entre 0,1% a 0,2%, o que leva a pensar que este parâmetro realmente é pouco influenciado pela saturação deste gás. Segundo Fridovich (2004) o animal infectado com o vírus da mancha branca apresenta diminuição no consumo de oxigênio podendo diminuir o impacto deste fator.

Parâmetros imunológicos de camarões sofrem influências de vários fatores ambientais como temperatura, salinidade (Wang & Chen, 2006) e amônia (Jiang et al., 2004). Parâmetros de qualidade de água, físicos ou químicos, estágio de desenvolvimento e a luminosidade podem alterar a sensibilidade do camarão a falta de oxigênio (Zhang et al., 2006). Segundo Bachère (2000) os parâmetros imunológicos dos

crustáceos, *L. vannamei* em particular, são extremamente sensíveis e podem sofrer as mais diversas influências levando a alteração sem uma justificativa aparente.

É prudente considerar que a alteração de oxigênio pode induzir a algum mecanismo compensatório ou ainda atuar sobre outros elementos não levados em consideração no presente trabalho como, por exemplo, a hemocianina, que, segundo Zhang et al. (2004) e Lei et al. (2008), exerce função anti viral.

CONCLUSÃO:

As variações na saturação de oxigênio influenciam a suscetibilidade dos animais ao vírus. A menor saturação, 30%, aumenta a suscetibilidade dos camarões ao vírus da mancha branca e a saturação em 100% atenua o impacto do vírus. Contudo não houve influência significativa sobre a contagem total de hemócitos e a avaliação das espécies reativas de oxigênio. Os parâmetros avaliados não refletiram o impacto das diferentes saturações de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- Bachère E. 2000. Shrimp immunity and disease control. *Aquaculture* 191: 3-11,
- Barraco M.A., Perazzolo L.M., Rosa R.D. *Imunologia Del Camaron*. Morales, Q.V.; Cuellar-Anjel, J. Guia Tecnica - Patologia e imunologia de camarones penaeideos. Programa CYTEC Red II, Panamá, Rep de Panamá 2008: 172-224.
- Cheng W., Liu C.H., Hsu J.P., Chen J.C. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant prawn *Machrobachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. *Fish & Shellfish Immunology* 13, 351-356.
- Dean T.L. & Richardson J. 1999. Response of seven species of native freshwater fish and a shrimp to low levels of dissolved oxygen. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 33: 99-106.
- Fridovich I. 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* 3: 13-16.

Jiang G., Yu, R., Zhou M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture* 241: 61-75.

Jiang L., Pan L., Bo F. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 185 – 188.

Jiravanichpaisal P., Söderhäll K., Söderhäll I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 265-275.

Jiravanichpaisal P., Sricharoen S., Söderhäll I., Söderhäll K. 2006. White spot syndrome virus (WSSV) interaction with crayfish haemocytes. *Fish and shellfish Immunology* 20: 718-727.

Le Moullac G. & Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.

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

Lei K., Li F., Zhang M., Yang H., Luo T., Xu X. 2008. Difference between hemocianin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-WSSV defense. *Developmental and Comparative Immunology* 32: 808-813.

Lightner D.V. & Redman R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. *Aquaculture* 164: 201 – 220.

Liu B., Yu Z., Song X., Guan Y., Jian X., He J. 2006. The effect of acute salinity change on white spot syndrome outbreaks in *Fenneropenaeus chinensis*. *Aquaculture* 253: 163-170.

Mathew S., Kumar K. A., Anandan R., Nair P. G. V., Devadasan K. 2007. Changes in tissue defence system in white spot syndrome virus (WSSV) infected *Penaeus monodon* *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C* 145: 351-320.

Mercier L., Palacios E., Campa-Córdova A.I., Továr-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.

Mugnier C. & Soyez C. 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. *Aquaculture* 244: 315-322.

Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gabriela G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E., Rosas C. 2006. Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251: 416-429.

Peinado-Guevara L.I. & López-Meyer M. 2006. Detailed monitoring of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp commercial ponds in Sinaloa, Mexico by nested PCR. *Aquaculture* 251: 33-45.

Perazzolo L.M., Gargioni R., Ogliari P., Barracco M.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214: 19-33.

Prior S., Browdy C.L., Shepard E.F., Laramore R., Parnell P.G. 2003. Controlled bioassay systems for determination of lethal infective doses of tissue homogenates containing Taura syndrome or white spot syndrome virus. *Diseases of aquatic organisms* 54: 89-96.

Rahman M.M., Bonilla C.M.E., Corteel M., Lima J.J.D., Wille M., Sanz V.A., Pensaert M.B., Sorgeloos P., Nauwynck H.J. 2006. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261: 842 – 849.

Rahman M.M., Corteel M., Dantas-Lima J.J., Wille M., Alday-Sanz V., Pensaert M.B., Sorgeloos P., Nauwynck H.J. 2007. Impact of daily fluctuations of optimum (27 °C) and high water temperature (33 °C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). *Aquaculture* 269: 107-113.

- Ruiz-Velazco J.M.J., Hernández-Llamas A., Gomez-Muñoz V.M., Magallon F.J. 2010. Dynamics of intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* affected by white spot disease. *Aquaculture* 300: 113-119.
- Sarathi M., Ishaq Ahmed V.P., Venkatesan C., Balasubramanian G., Prabavathy J., Sahul Hameed A. S. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture* 271: 8-20.
- Song Y.L. & Hsieh Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18, 201-209.
- Wang F.I. & Chen J.C. 2006. Effect of salinity on immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Fish & Shellfish Immunology* 20: 671-681.
- Wang Y.T., Liu W., Seah J.N., Lam C.S., Xiang J.H., Korzh, V. ,Kwang J. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infect specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Disease of Aquatic Organisms* 52: 249-259.
- Zenteno-Savín T., Saldierna R., Sandoval M.A. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comparative Biochemistry. Physiology* C142: 301 – 308.
- Zhang P., Zhang X., Li J., Huang G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 256: 579-587.
- Zhang X., Huang C., Qin Q. 2004. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp *Penaeus monodon*. *Antiviral Research* 61: 93-99.
- Zar J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. 718p.

Capítulo 3

**ESTADO IMUNITÁRIO DE CAMARÕES BRANCO DO
PACÍFICO MANTIDOS SOBRE DIFERENTES SATURAÇÕES
DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E DESAFIADOS COM *Vibrio
alginolyticus*.**

Mauricio Lehmann, Delano D. Schleder, Adolfo Jatobá, Luciane
Perazzolo, Luis Vinatea

Artigo formatado de acordo com as normas da revista “Pesquisa
Veterinária Brasileira”

ABSTRACT

This study aimed to investigate the influence of different levels of oxygen saturation on survival and on immunological parameters total count of hemocytes and reactive oxygen species in the marine shrimp *Litopenaeus vannamei* infected experimentally with the *Vibrio alginolyticus*. During 72 hours the hemolymph were collected daily from the shrimp inoculated with the bacteria, maintained in aquaria with 30, 60 and 100% of oxygen saturation. The cumulative mortality of the animals challenge with the *Vibrio alginolyticus* bacteria is lower in the 100% oxygen saturation. However, the oxygen saturation did not affect the total count of hemocytes and reactive oxygen species (ROIS) of the shrimp. Thus the decrease in oxygen saturation to 30% appears to increase the susceptibility of the shrimp to the vibrio, however without presenting a significant influence on the total count of hemocytes and evaluation of reactive oxygen species.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio alginolyticus*, total hemocytes count, oxygen reactive species

RESUMO

O presente estudo teve por finalidade verificar a influência de diferentes níveis de saturação de oxigênio sobre a sobrevivência e sobre os parâmetros imunológicos contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* desafiados experimentalmente com *Vibrio alginolyticus*. Por um período 72 horas foram realizadas coletas diárias de hemolinfa dos camarões mantidos em aquários com 30, 60 e 100% de saturação de oxigênio. A mortalidade cumulativa dos animais desafiados com *Vibrio alginolyticus* foi maior na saturação de 30% de oxigênio. No entanto, as diferentes saturações não afetaram a contagem total de hemócitos ou as espécies reativas de oxigênio (EROs) dos animais. A diminuição da saturação de oxigênio até 30% parece aumentar a susceptibilidade do camarão ao *Vibrio*, porém, sem influenciar significativamente a contagem total de hemócitos ou a avaliação das espécies reativas de oxigênio.

Palavras chaves: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio alginolyticus*, contagem total de hemócitos, espécies reativas de oxigênio

INTRODUÇÃO

O oxigênio é um fator indispensável ao desenvolvimento de qualquer organismo heterotrófico (Vinatea, 2010), sendo o segundo fator limitante na produção aquícola depois do alimento (Boyd e Tucker, 1998). A concentração de oxigênio dissolvido na água exerce influência sobre os parâmetros imunológicos (Direkbusarakom & Danayadol, 1998; Jiravanichpaisal et al., 2004) assim como a intensidade luminosa, o pH e a salinidade alteram a sensibilidade do camarão *L. vannamei* em níveis extremos de hipóxia (Zhang et al., 2006). Segundo Le Moullac et al. (1998) baixos níveis de oxigênio, comuns em viveiros de camarões, e alta densidade, elevam a sensibilidade de camarões para as vibrioses.

As bactérias potencialmente patogênicas dispersas no meio não indicam necessariamente uma doença (Morales-Covarrubias, 2008). A vibriose em camarões marinhos é considerada normalmente como uma infecção secundária (Mohney et al., 1994) ameaçando principalmente a produção nas larviculturas e berçários (Saunier et al., 2000). Porém, estas bactérias são potencialmente patogênicas para vertebrados e invertebrados marinhos podendo gerar gastroenterites, lesão nos olhos, hemorragias, ascites e vasculites (Balebona et al., 1998; Alcaide et al., 2001; Austin e Zhang, 2006). Variações de parâmetros ambientais como pH, salinidade e amônia podem alterar a virulência de bactérias como por exemplo do *Vibrio alginolyticus* e do *Vibrio harveyi* (Liu & Chen, 2004).

Pelo envolvimento de vários tipos de tecidos, os mecanismos de defesa contra infecções bacterianas ainda não estão totalmente elucidados (Burgents et al., 2005). O desenvolvimento de bioensaios para o monitoramento da imunidade dos camarões submetidos a situações de estresse pode estabelecer formas de monitoramento periódico, indicando momentos de maior fragilidade do animal às doenças (Bachère, 2000).

O presente estudo teve por finalidade verificar a influência de diferentes níveis de saturação de oxigênio sobre a sobrevivência e certos parâmetros imunológicos tais como contagem total de hemócitos e espécies reativas de oxigênio em camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* desafiados experimentalmente com *Vibrio alginolyticus*.

MATERIAL E METODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bioensaios do Instituto Federal Catarinense, Campus Araquari, Santa Catarina, Brasil em 2009 e 2010.

Material biológico

Foram utilizados 360 animais de $10 \pm 1,5\text{g}$, da espécie *Litopenaeus vannamei*, provenientes de linhagem livre dos patógenos específicos (SPF, do inglês *Specific Pathogen Free*) de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias (OIE) da Genearch Aquacultura LTDA (Praia de Pititinga, Rio Grande do Norte) e cultivados no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. Estes animais foram transportados por via rodoviária até o Laboratório de Bioensaios, permanecendo em aclimação por um período de 48 horas, com temperatura de 25°C , 35‰ de salinidade, aeração e sem receber alimentação durante todo o período experimental, conforme recomendação de Pascual et al. (2006).

Inóculo experimental

A cepa selecionada de *Vibrio alginolyticus* utilizada no experimento teve origem no Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. O material foi repicado em placa de Petri contendo meio de cultura agar tiosulfato citrato bile sacarose (TCBS, Himedia), para confirmação de pureza (colônias sacarose positiva). Em seguida uma colônia de bactérias foi inoculada em meio de cultura caldo de coração e cérebro (BHI, Himedia) com 3% de NaCl e incubada a 30°C por 18 h. Após o crescimento, a cultura foi diluída em série (1:10) até a diluição 10^{-8} , sendo semeadas em agar triptona de soja (TSA, Himedia) 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 12° poço, e a absorbância medida em leitor de microplaca no comprimento de onda de 630nm, para confecção da curva de crescimento (Concentração bacteriana x Absorbância)(Silva et al., 2011).

Para a infecção experimental, o inóculo cultivado em BHI foi centrifugado 20 minutos a $1800 \times g$. O sobrenadante foi descartado e o precipitado suspenso em solução salina estéril 2% (SSE) na proporção para que a suspensão se mantivesse em $1,2 \times 10^5 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$ de *V. alginolyticus* segundo a curva de crescimento feita anteriormente.

Condições experimentais

O trabalho foi conduzido com dois grupos de animais, um contaminado e outro não, com quatro repetições para cada tratamento. Foram utilizadas 24 caixas plásticas com tampa e capacidade de 60 litros, mantidas com três diferentes saturações de oxigênio: 100%, 60% e 30%. A água utilizada foi filtrada e esterilizada com radiação ultravioleta. Foram alojados 15 animais em cada caixa respeitando a ocupação máxima de um animal para quatro litros de água (Jiang et al., 2005; Le Moullac, 1998). O sistema de controle de oxigenação foi composto por duas redes de fornecimento de gases, uma rede fornecida ar pressurizado por um soprador de 0,25cv, distribuído por um conjunto de mangueiras para cada uma das 24 caixas com um controle individual de fluxo junto a cada uma (ANEXO I). Uma segunda rede distribuía nitrogênio através de mangueiras para as caixas onde o nível de saturação proposto era de 30 ou 60%, também dotadas de controle individual. O nível de saturação desejado foi alcançado pelo borbulhamento de nitrogênio (Jiang et al., 2005) até próximo a saturação de oxigênio requerida e pelo consumo de oxigênio pelos animais (Le Moullac et al., 1998; Mugnier & Soye, 2005). A manutenção do nível de saturação de oxigênio foi obtida pelo fluxo de ar controlado. A manutenção de uma lâmina de EVA (etileno vinil acetato) (ANEXO II) sobre a água restringia as trocas gasosas com a atmosfera pela diminuição interface ar água. A avaliação do nível de oxigênio foi realizada com três medições diárias com o uso de um oxímetro modelo 550A fabricado pela empresa YSI. Os animais foram mantidos por 24 horas na saturação de oxigênio preconizada para o experimento antes do desafio experimental.

Após este período os animais foram desafiados com *Vibrio alginolyticus*. A coleta de hemolinfa para análise de THC e ROIS foi realizada a cada 24h.

Desafio experimental

Os animais, do grupo contaminado, foram inoculados com 50 μ l de solução contendo *V. alginolyticus* ($1,2 \times 10^5$ por animal UFC \cdot ml $^{-1}$) os animais do grupo não contaminado receberam solução salina, utilizando-se agulha 13X4,5. A inoculação foi realizada no músculo abdominal entre o primeiro e segundo segmento na região dorsal, tendo-se o cuidado de desviar a linha central evitando-se qualquer estrutura delicada como o cordão neural.

Coleta de material

A coleta de material foi realizada em pools de três animais por caixa por tratamento. O procedimento foi realizado com seringa refrigerada com anticoagulante MAS (336mM NaCl, 115mM glicose, 27 mM de citrato de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2) na proporção de 1:2, sendo a diluição final em 1:3. A coleta foi realizada na região entre o último esternito cefalotorácico e primeiro abdominal com seringa de 1,0 ml acoplada a agulha 13X4,5. Uma alíquota de 30µl foi separada em uma solução de anticoagulante com 4% de formol (formol MAS) para contagem de células numa câmara de Neubauer.

A produção de ânion superóxido (O_2^-) pelos hemócitos das espécies analisadas foi quantificada pelo método de redução do NBT (Sigma) (nitro-blue-tetrazolium) (adaptado de Song e Hsieh, 1994; Perazzolo et al., 2002), um corante redox amarelado solúvel, que durante a fagocitose é capturado para dentro do vacúolo fagocítico juntamente com a partícula endocitada. O NBT é quimicamente reduzido pelos ânions superóxido a formazan, que é um composto insolúvel de coloração azul-púrpura, que pode ser visualizado diretamente ao microscópio ou solubilizado pelo DMSO (dimetil sulfóxido) e quantificado espectrofotometricamente a uma absorvância de 630 nm.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância com parcelas subdivididas no tempo ($\alpha < 0,05$). Uma vez encontrada diferenças entre as médias, foi utilizado o teste de Tukey para separação de médias ($\alpha < 0,05$) (Zar, 1984).

RESULTADOS

Os animais após a inoculação apresentaram uma intensa opacidade da musculatura de forma radial em relação ao ponto de inoculação (Anexo III).

Foi observada uma menor mortalidade de animais nos aquários com saturação de oxigênio de 100% (Figura 2).

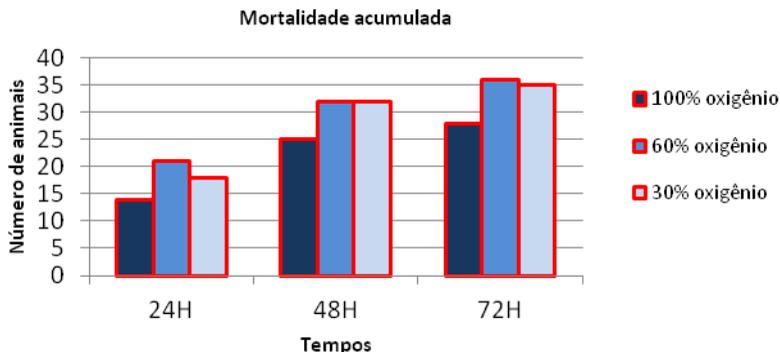


Figura 2: Número acumulado de camarões *L. vannamei* encontrados mortos durante do experimento, submetidos a três saturações de oxigênio e inoculados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* em diferentes tempos.

Não foi observada diferença significativa na contagem total de hemócitos no grupo de animais infectados entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados ($p \geq 0,05$). A contagem total de hemócitos dos animais desafiados com *V. alginolyticus* apresentou uma queda nas 24 horas apenas na saturação de 30%, mantendo-se estável até 48 horas com recuperação até 72 horas. Os animais não contaminados apresentaram a contagem de hemócitos estável entre 15×10^6 e 20×10^6 sem diferenças significativas. Os animais apresentaram alteração do comportamento com letargia e breves momentos de agitação. A mortalidade apresentou um pico nas 48 horas, principalmente no grupo dos animais com 60% de saturação de oxigênio, reduzindo-se nas 24 horas seguintes (Tabela 3).

Não foi observada diferença significativa nas espécies reativas de oxigênio dos camarões entre os tratamentos em nenhum dos tempos avaliados ($p \geq 0,05$). A produção de ânions peróxido apresentou elevação após a inoculação oscilando até o final do experimento (Tabela 4). Os animais não contaminados apresentaram valores de absorvância estáveis com leve aumento nas 24 horas estabilizando-se com valores semelhantes aos dos animais infectados (0,15 a 0,20).

Tabela 3: Contagem total de hemócitos em camarões marinhos da espécie *L. vannamei* submetidos a três diferentes saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com a bactéria *Vibrio alginolyticus*

Saturação de oxigênio	Contagem total de hemócitos (células x 10 ⁶ ml ⁻¹)			
	Horas			
	0	24	48	72
100%	9,45±	9,33±	9,10±	13,04±
	0,759x10 ⁶	0,735x10 ⁶	3,858x10 ⁶	4,955x10 ⁶
60%	12,3±	19,72±	14,84±	20,08±
	1,279x10 ⁶	3,079x10 ⁶	6,530x10 ⁶	4,731x10 ⁶
30%	20,9±	9,01±	15,69±	30,57±
	1,537x10 ⁶	1,372x10 ⁶	6,777x10 ⁶	15,655x10 ⁶

Tabela 4: Produção de ânions peróxido em células de camarões marinhos da espécie *L. vannamei* submetidos a três saturações de oxigênio dissolvido e desafiados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* em diferentes tempos expressa pela absorbância da redução do NBT *in vitro*.

Saturação de oxigênio	Produção de ânions peróxido (absorbância 630nm)			
	Horas			
	0	24	48	72
100%	0,073	0,148	0,157	0,214
	±0,025	±0,062	±0,080	±0,035
60%	0,074	0,201	0,202	0,204
	±0,164	±0,087	±0,059	±0,005
30%	0,083	0,206	0,074	0,185
	±0,043	±0,125	±0,049	±0,028

DISCUSSÃO

A diferença entre o número de animais mortos encontrados em cada um dos tratamentos sugere que haja influencia do oxigênio dissolvido mesmo sem diferença significativa entre os parâmetros imunológicos avaliados. Segundo Ruiz-Velazco et al. (2010) o uso de aeração mais intensa diminui o impacto de doença viral em fazendas de camarão mexicanas.

Após 72 horas de bioensaio não foi encontrada diferença significativa nos parâmetros imunológicos contagem total de hemócitos e ROIs entre os camarões dos três tratamentos avaliados. Ao longo do

tempo a contagem de hemócitos apresentou uma leve queda após a inoculação. No local da inoculação surgiu uma região de opacidade da musculatura que também foi encontrado por Liu et al. (2004) e Burgents et al. (2005). Esta alteração pode ser resultado da migração de hemócitos, importantes na defesa contra micro-organismos (Haug et al., 2002), para sequestro e posterior fagocitose das bactérias (Sarathi et al., 2007), fato que pode justificar a queda inicial da contagem total de hemócitos com recuperação na sequência, resultado semelhante ao encontrado por Cheng et al. (2002). Este padrão difere das infecções virais, onde as células são o alvo do agente infeccioso, dando origem a uma acentuada queda subsequente (Wang et al., 2002).

A produção de ânions peróxido teve um comportamento oscilante sem tendência definida. Zenteno-Savín et al. (2006) afirmam que em ambientes com 1 mg l^{-1} de oxigênio dissolvido não existe influência sobre a produção de íons peróxido. O mesmo autor afirma que hipóxias prolongadas não intensificam efeitos, confirmando o achado por Mugnier e Soyez (2005) e Dean e Richardson (1999), em que os camarões podem se adaptar a condições de hipóxia quando submetidos por mais de 24 horas. Segundo Le Moullac e Haffner (2000) e Le Moullac et al. (1998) a atividade da célula não se altera perante hipóxia, incluindo a NADPH oxidase, responsável pela produção de íons peróxido (EROS). Fridovich (2004) afirma que o percentual de consumo de oxigênio para espécies reativas é entre 0,1% a 0,2%, o que torna reduzida a influência da saturação de oxigênio sobre este recurso imunológico.

É importante considerar que alterações ambientais como salinidade, temperatura, pH e intensidade de luz ou, ainda, alterações fisiológicas como peso do animal e condição alimentar podem alterar a sensibilidade do *L. vannamei* ao oxigênio (Zhang et al., 2006), o que pode tornar as condições experimentais muito específicas. Em outras espécies de crustáceos como o camarão de água doce *Macrobachium rosenbergii* foram encontradas diferenças significativas na contagem total de hemócitos e na produção de ânions peróxido (Cheng et al., 2002) em testes superiores a 120 horas e com níveis de oxigênio de 2,75 mg/l ou menores .

CONCLUSÃO:

As concentrações de oxigênio de 30, 60 e 100% não influenciaram a contagem total de hemócitos e as espécies reativas de oxigênio em camarões brancos do pacífico desafiados

experimentalmente com *V. alginolyticus* durante o período de 72 horas. A saturação de 100% diminuiu a sensibilidade dos camarões à bactéria.

REFERÊNCIAS:

Alcaide E., Gil-Sanz C., Sanjuan E., Estev D., Amaro C., Silveira L. 2001. *Vibrio Harvey* causes disease in seahorse, *Hippocampus sp.* Journal of Fish Disease 24: 311-313.

Austin B. & Zhang X. H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in applied Microbiology 43: 119-124.

Bachère E. 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture 191: 3-11.

Balebona C.M., Andreu M.J., Bordas M.A., Zorrilha I., Moriñigo M. A., Borrego J.J. 1998. Pathogenicity of vibrio alginolyticus for Cultured Gilt-head Sea Bream (*Sparus aurata L.*). Applied and Environmental Microbiology, v 64 n°11: 4269-4275.

Boyd C.E. & Tucker C.S. Pond Aquaculture Water Quality Management. Norwell, Kluwer Academic Publishers, 1998, 700p.

Burgents J.E., Burnett L.E., Stabb E.V., Burnett K.G. 2005. Localization and bacteriostasis of *Vibrio* induced into the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Developmental & Comparative Immunology 25: 681-691.

Cheng W., Liu C.H., Hsu J.P., Chen J.C. 2002. Effect of hypoxia on the immune response of giant prawn *Machrobachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. Fish and Shellfish Immunology 13: 351-356.

Dean T.L. & Richardson J. 1999. Responses of seven species of native freshwater fish and a shrimp to low level of dissolved oxygen. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research 33: 99-106.

Direkbusarakom S. & Danaydol Y. 1998. Effect of oxygen depletion on some parameters of immune system in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) in FLEGEL, T.W. Advances in shrimp biotechnology. Natinal Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

- Fridovich I. 2004. Mitochondria: are they the seat of senescence? *Aging Cell* 3: 13–16.
- Haug T., Kjuul A.K., Stensvag K.; Sandsdalen, E., Styrvold O.B. 2002. Antibacterial activity in four marine crustacean decapods. *Fish & Shellfish Immunology* 12: 371-385.
- Jiang L., Pan L., Bo F. 2005. Effect of dissolved oxygen on immune parameters of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology* 18: 185–188.
- Jiravanichpaisal P., Söderhäll K., Söderhäll I. 2004. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. *Fish & Shellfish Immunology* 17: 265-275.
- Le Moullac G. & Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. *Aquaculture* 191: 121-131.
- Le Moullac G., Soyez C., Saulnier D., Ansquer D., Avarre J.C., Levy P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. *Fish & Shellfish Immunology* 8: 621–629.
- Liu C.H., Cheng, W., Jung-Ping HSU J.P., CHEN J.C. 2004. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. *Disease of Aquatic Organisms* 61: 169-174.
- Mohney L.L., Lightner D.V., Bell T.A. 2004. An Epizootic of vibriosis in Ecuadorian pond-reared *Penaeus vannamei* Boone (Crustacea: Decapoda) *Journal of World Aquaculture Society* 25: 116–125.
- Morales-Covarrubia M.S. Enfermedades bacterianas. Morales, Q.V.; Cuellar-Anjel, J. Guia Tecnica - Patologia e imunologia de camarones penaeideos. Programa CYTEC Red II, Panamá, Rep de Panamá 2008: 119-134.
- Mugnier C. & Soyez C. 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. *Aquaculture* 244: 315-322.

Pascual C., Sánchez A., Zenteno E., Cuzon G. Gabriela G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E., Rosas C. 2006. Biochemical, physiological and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 251: 416-429.

Perazzolo L.M., Gargioni R., Ogliari P., Barracco M. A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture* 214: 19-33.

Ruiz-Velazco J.M.J., Hernández-Llamas A., Gomez-Muñoz V.M., Magallon, F.J. 2010. Dynamics of intensive production of shrimp *Litopenaeus vannamei* affected by white spot disease. *Aquaculture* 300: 113-119.

Sarathi M., Ishaq Ahmed V.P., Venkatesan C., Balasubramanian, G., Prabavathy J., Sahul Hameed A.S. 2007. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Aquaculture* 271: 8-20.

Saulnier D., Haffner P., Goarant C., Levy P., Ansquer D. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture* 191: 133-144.

Silva B.C., Mouriño J.L.P., Vieira F.L., Jatoba A., Seifert W.Q., Martins M.L. 2011. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture research* 43: 1-9.

Song Y.L. & Hsieh Y.T. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology* 18: 201-209.

Soto-Rodriguez A., Simoes N., Roque A., Gil B.G. 2006. Pathogenicity and colonization of *Litopenaeus vannamei* larvae by luminescent vibrios. *Aquaculture* 258: 109 – 115.

Vinatea Arana, L. Qualidade da água em aquicultura: princípios e praticas. Florianópolis, editora UFSC, 2010, 238p.

Wang Y.T., Liu W., Seah J.N., Lam C.S., Xiang J.H., Korzh V., Kwang J. 2002. White spot syndrome virus (WSSV) infect specific hemocytes of the shrimp *Penaeus merguensis*. *Disease of Aquatic Organisms* 52: 249-259.

Zar J.H. 1984. *Biostatistical analysis*. Englewood Cliffs, N. J., Prentice Hall. 718p.

Zenteno-Savín T., Saldierna R., Sandoval M.A. 2006. Superoxide radical production in response to environmental hypoxia in cultured shrimp. *Comp. Biochem. Physiol C*142: 301–308.

Zhang P., Zhang X., Li J., Huang G. 2006. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture* 256: 579-587.

CONCLUSÕES GERAIS:

- a) Os níveis mais altos de saturação de oxigênio resultaram em maior sobrevivência ao camarão *L. vannamei* quando submetido ao desafio com o vírus da mancha branca e com a bactéria *Vibrio alginolyticus*.
- b) A exposição de camarões da espécie *L. vannamei* infectados com o vírus da mancha branca a saturações de oxigênio de 30, 60 e 100%, por 96 horas, não demonstrou influenciar a contagem total de hemócitos na hemolinfa e a avaliação das espécies reativa de oxigênio.
- c) A exposição de camarões da espécie *L. vannamei* infectados com a bactéria *Vibrio alginolyticus* a saturações de oxigênio de 30, 60 e 100%, por 72 horas, não demonstrou influenciar a contagem total de hemócitos na hemolinfa e a avaliação das espécies reativa de oxigênio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

A realização de bioensaios é uma importante ferramenta para estabelecimento de padrões e condutas dentro de uma atividade. Os bioensaios realizados com o camarão *Litopenaeus vannamei* são conduzidos nas mais diversas condições, sejam físicas, químicas ou biológicas. Esta situação gera uma dificuldade muito grande de comparação de resultados ou até mesmo a utilização de dados para que se economize trabalho e dinheiro. É recomendável que sejam estabelecidas normas e padrões para uma evolução mais rápida.

A condução de bioensaios com inoculação viral encontra-se praticamente proibida no Brasil. Este trabalho sofreu a intervenção dos órgãos de vigilância sanitária estadual e federal por cerca de 20 meses. Não existe a atribuição de culpa uma vez que estes órgãos estavam fazendo o seu trabalho embasado em uma lei a qual devemos respeitar. Quando foi possível a realização do trabalho ele foi levado à frente dentro de todos os preceitos legais que envolvem este tipo de experimento. É importante ressaltar que o relacionamento entre os órgãos de fiscalização, pesquisa, extensão e de ensino seja prioritariamente estreitada no sentido de permitir o desenvolvimento de pesquisas com todos e quais quer tipos de vírus para que as mentes privilegiadas de nosso país e nosso estado percam a dependência de pesquisadores estrangeiros.

Os resultados encontrados por outros autores conduzem a propor níveis mais baixos de oxigênio para os bioensaios, com situações agudas de avaliação em períodos mais curtos dentro das 24 horas iniciais. O resultado da mortalidade acumulada com menores índices nas maiores saturações indica a busca de outros parâmetros de qualidade imunológica talvez em níveis moleculares por intermédio da expressão gênica de proteínas.

REFERENCIAS DA INTRODUÇÃO:

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

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

BALEBONA, C. M.; ANDREU, M. J.; BORDAS, M. A.; ZORRILHA, I.; MORIÑIGO, M.A.; BORREGO, J.J. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-head Sea Bream (*Sparus aurata L.*). **Applied and Environmental Microbiology**, v 64 n°11, p. 4269-4275, Nov 1998.

BARRACO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. **Imunologia Del Camaron.** MORALES, Q.V.; CUELLAR-ANJEL, J. Guia Tecnica - Patologia e imunologia de camarones penaeideos. Programa CYTEC Red II, Panamá, Rep de Panamá 2008, p. 172-224.

BARRACCO, M. A. Mecanismos de Resistência a Doenças em Crustáceos In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTO, R.M., LIZAMA, M.A.P. (Org.). **Sanidade de Organismos Aquáticos.** São Paulo, p.51-74, 2004.

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

CAMPA-CORDOVA, A. I.; HERNANDEZ-SAAVEDRA, N. Y.; DE PHILIPPIS, R.; ASCENCIO,F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American White shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucanand sulfate polysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v.12, p. 353-366, Apr 2002.

CHANG, C-F.; LEE, P-P; LIU, C. H.; WINTON, C. Trichlorfon an organphosphorus insecticide, depresses imune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of giant freshwater praw *Machrobachium rosenbergii*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 574-585, Apr 2006.

DEAN, T. L.; RICHARDSON, J. Response of seven species of native freshwater fish and a shrimp to low levels of dissolved oxygen. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 33, p. 99-106, Mar 1999.

ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; ALDAY-SANZ, V.; WILLE, M.; SORGELOOS, P.; PENSAERT, M. B.; NAUWYNCK, H. J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of white spot syndrome virus. **Journal of Fish Diseases**, v. 31, p. 1-18, Jan 2008.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. Rome: Sofia, 2010. 197p.

FUNGE-SMITH, S. J.; BRIGGS, M. R. P. Nutrient budgets in intensive shrimp ponds: implications for sustainability. **Aquaculture**, v. 164, p. 117-133, May 1998.

GALAVIZ-SILVA, L.; MOLINA-GARZA, Z. J.; ALCOCER-GONZALEZ, J. M.; ROSALES-ENCINAS, J. L.; IBARRA-GAMEZ, C. White spot syndrome virus genetic variants detected in Mexico by a new multiplex PCR method. **Aquaculture**, v. 242, p. 53-68, Dec 2004.

GARGIONI, R.; BARRACO, M. A. Hemocytes of the *Palaemonids Macrobrachium rosebergii* and *M. acanthurus*, and of the Penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, v. 236, p. 209-221, Jun 1998.

HASSON, K. W.; FAN, Y.; REISINGER, T.; VENUTI, J.; VARMER, P. W. White-spot syndrome virus (WSSV) introduction into the Gulf of Mexico and Texas freshwater systems through imported, frozen baitshrimp. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 71, p. 91-100, Jul 2006.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, p. 128-150, Mar 2005.

JIANG, G.; YU, R.; ZHOU, M. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of *Penaeus Japonicus* to virulence of white spot virus. **Aquaculture**, v. 241, p. 61-75, Nov 2004.

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

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, p. 213–236, Jun 2006.

JIRAVANICHPAISAL, P.; SÖDERHÄLL, K.; SÖDERHÄLL, I. Effect of water temperature on the immune response and infectivity pattern of white spot syndrome virus (WSSV) in freshwater crayfish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, p. 265-275, Sep 2004.

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

JOHNSON, P. T. A review of fixed phagocytic and pinocytic cells of decapod crustaceans, with remarks on haemocytes. **Developmental Comparative Immunology**, v. 11, p. 679-704, Autumn 1987.

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

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

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

LEI, K.; LI, F.; ZHANG, M.; YANG, H.; LUO, T.; XU, X. Difference between hemocyanin subunits from shrimp *Penaeus japonicus* in anti-wssv defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 808-813, Jan 2008.

LIGHTNER, D. V. ;REDMAN, R. M. Shrimp disease and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201-220, May1998.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p.110-130, Jan 2011.

LIU, C. H.; CHENG, W.; Jung-Ping HSU, J. P.; CHEN, J. C. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16S rDNA sequencing. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 61, p. 169-174, Oct 2004.

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

LO, C. F.; HO, C. H.; EN-PENG, S.; CHEN, C. H.; HSU, H. C.; CHIU, Y. L.; CHANG, C. F.; LIU, K. F.; SU, M. S.; WANG, C. H.; KOU, C.H. White spot syndrome baculovirus (WSBV) and other arthropods. **Disease in aquatic organisms**, v. 27, p. 215-225, Jan 1996.

MILLAR, D. A.; RATCLIFFE, N. A. **Invertebrates**. In: RJ Turner (ed), Immunology: a comparative approach. John Wiley & Sons, New York. 30-66, 1994.

MORALES-COVARRUBIA, M. S. **Enfermedades bacterianas**. MORALES, Q. V.; CUELLAR-ANJEL, J. Guia Tecnica - Patologia e imunologia de camarones penaeideos. Programa CYTEC Red II, Panamá, Rep de Panamá 2008, p 119-134.

MUÑOZ, M.; CEDEÑO, R.; RODRÍGUEZ, J.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; MIALHE, E.; BACHÉRE, E. Measurement of reactive oxygen intermediate production in haemocytes of the penaeid shrimp,

Penaeus vannamei. **Aquaculture**, v.191, p. 89-107, Nov 2000.

NUNAN, L. M.; POULOS, B. T; Lightner, D. V. The detection of White Spot Syndrome Virus_WSSV and Yellow Head Virus _YHV/ in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v. 160, p.19-30, Jan 1998.

PERAZZOLO, L. M. **Estudo do sistema imune do camarão marinho *Penaeus paulensis*, com ênfase no sistema pró-fenoloxidase**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 122p, 1994.

RAHMAN, M. M.; BONILLA, C. M. E.; CORTEEL, M.; LIMA, J. J. D.; WILLE, M.; SANZ, V. A.; PENSAERT, M. B.; SORGEL00S, P.; NAUWYNCK, H. J. Effect of high water temperature (33°C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 261, p. 842 – 849, Dec 2006.

RAHMAN, M. M.; CORTEEL, M.; DANTAS-LIMA, J. J.; WILLE, M.; ALDAY-SANZ, V.; PENSAERT, M. B.; SORGEL00S, P.; NAUWYNCK, H. J. Impact of daily fluctuations of optimum (27 °C) and high water temperature (33 °C) on *Penaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v. 269, p. 107-113, Sep 2007.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, v. 97, p. 183-350, 1985.

REYES, A.; SALZAR, M.; GRANJA, C. Temperature modifies gene expression in subcuticular epithelial cells of white spot syndrome virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 31, p. 23-29, 2007.

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

SANCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. **Veterinary research**, v. 41:43, Nov 2010.

SAULNIER, D.; HAFFNER, P.; GOARANT, C.; LEVY, P.; ANSQUER, D.; Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. **Aquaculture**, v.191, p. 133-144, Nov 2000.a

SAULNIER, D.; AVARRE, J. C.; LE MOULLAC, G.; ANSQUER, D.; LEVY, P.; VOUNAU, V. Evidence that *Vibrio penaeicida* is the putative etiological agent of syndrome 93 in New Caledonia and development of a rapid and sensitive PCR assay for its detection in shrimp and sea water. **Disease of Aquatic Organisms**, v. 40, p.109-115, Nov 2000.b

SÖDERHÄLL, K., SMITH, V. J., JOHANSSON, M. W. Exocytosis and uptake of bacteria by isolated hemocyte populations of two crustaceans

evidence for cellular cooperation in the defense reactions of arthropods. **Cell Tissue Research**, v. 245, p. 43-49, 1986.

SÖDERHÄLL, K.; CERENIUS, L. Crustacean immunity. **Annual Review Fish Disease**, v. 2, p. 3-23, 1992.

SONG, Y. L.; HSIEH, Y. T. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances : analysis of reactive oxygen species. **Developmental and Comparative Immunology**, v.18, p. 201-209, May 1994.

SUTTLE, C. A. Marine viruses: major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 801–812, Oct 2007.

VANDENBERGHE, J.; VERDONCK, L.; AROZARENA, R. R.; RIVERA, G.; BOLLAND,A.; BALLADARES, M.; GIL, B. G.; CALDERON, J.; SORGELOOS, P.; SWINGS, J. Vibrios Associated with *Litopenaeus vannamei* Larvae, Postlarvae, Broodstock, and Hatchery Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n°66, p. 2592–2597, Jun 1999.

WANG, F. I.; CHEN, J. C. Effect of salinity on immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsalae* subsp. *Damsalae*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 20, p. 671-681, May 2006.

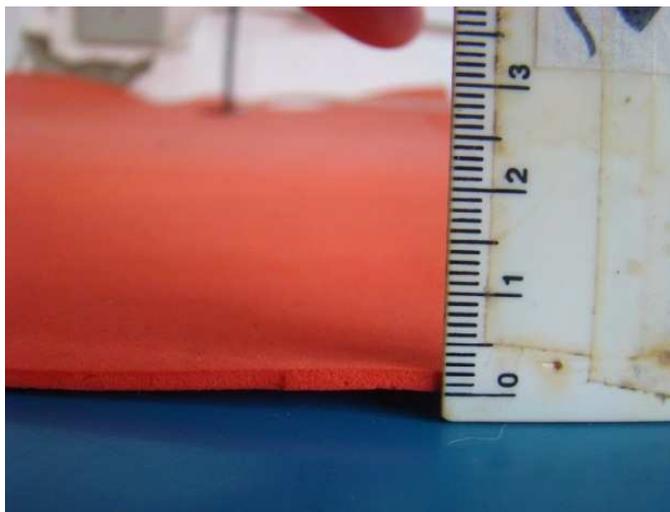
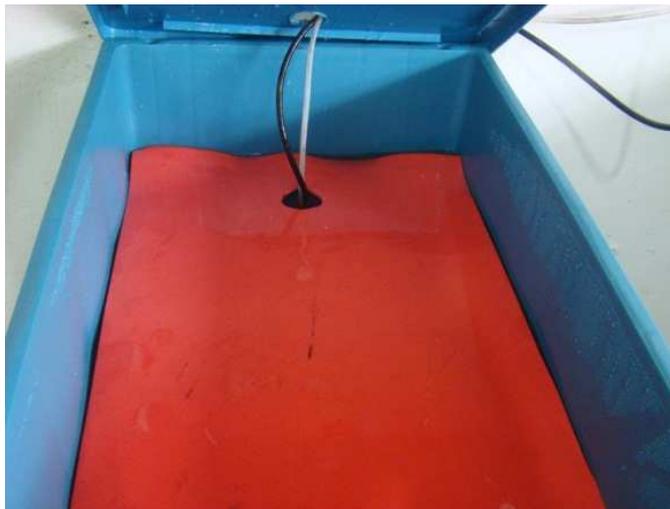
WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radicals Biology & Medicine**, v. 3, p. 249–258, Sep 1994.

ZHANG, X.; HUANG, C.; QIN, Q. Antiviral properties of hemocyanin isolated from shrimp. **Antiviral research**, v. 61, p. 93-99, Feb 2004.

ZHANG, P.; ZHANG, X.; LI, J.; HUANG, G. The effects of body weight, temperature, salinity, pH, light intensity and feeding condition on lethal DO levels of whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). **Aquaculture**, v. 256, p. 579-587, Jun 2006.

ANEXO I: Sistema de distribuição dos gases a cada uma dos aquários.



ANEXO II: Disposição da lâmina de EVA sobre a lamina de água.

ANEXO III: Alteração da musculatura dos camarões nos locais de inoculação.

