



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

**AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*
(BOONE,1931) EM CULTIVOS COM OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA
MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV).**

ANDREZZA MELO COSTA

Monografia apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
FEVEREIRO/2006



Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C87a Costa, Andrezza Melo.
Avaliação imunológica do camarão *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931) em cultivos com ocorrência do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) / Andrezza Melo Costa. – 2006.
30 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2006.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Carlos Cunha Martins.

1. Engenharia de pesca. I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Pedro Carlos Cunha Martins, D.Sc
Orientador/Presidente

Prof^a. Elenise Gonçalves de Oliveira, D.Sc
Membro

Eng. De Pesca Henrique José Mascarenhas, M.Sc
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof^a. Artamizia Maria Nogueira Montezuma, M.Sc
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial ao meu pai, por toda a força e todo o apoio dados sempre, sem os quais eu não teria conseguido chegar onde estou.

À professora Teresa Cristina Vasconcelos Gesteira, por todos os ensinamentos passados, pelo apoio e pela paciência durante esses quase três anos de trabalho, que contribuíram muito para a minha formação.

Ao professor Pedro Carlos Martins Cunha que se prontificou a me orientar, apesar de todas as adversidades que encontramos ao longo deste trabalho.

Ao professor Antônio Aduato Fonteles-Filho pela ajuda com a parte da estatística, essencial para a realização deste trabalho.

Aos profissionais da fazenda Compescal, especialmente Joseuda e Hudson, que me receberam e me deram todo o suporte necessário para viabilizar a realização deste trabalho.

Em especial aos meus amigos que fazem o CEDECAM: Pedro Alexandre, Diego, João, Graça, Cândida e Rubens, e aos amigos do Labomar Cleyton e Esaú.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE QUADROS.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. O Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).....	03
2.2. Os Hemócitos.....	05
2.3. Contagem de Hemócitos.....	08
2.4. Sistema de Coagulação.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1. Coleta dos Animais.....	10
3.2. Coleta da Hemolinfa para o CTH.....	11
3.3. Medida do Tempo de Coagulação da Hemolinfa.....	12
3.4. Contagem do Número Total de Células.....	12
3.5. Análises Estatísticas.....	13
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSSÃO.....	16
6. CONCLUSÕES.....	19
7. RECOMENDAÇÕES.....	19
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20



RESUMO

A carcinicultura brasileira tem se desenvolvido como um importante agronegócio, especialmente na Região Nordeste. Entretanto, como em qualquer cultivo animal, esta atividade enfrenta problemas com doenças, tanto de origem bacteriana como viral, as quais afetam a produção de forma significativa. A partir de 2002 o cultivo de camarão passou a lidar com mais um vírus, posteriormente identificado como o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). A avaliação de parâmetros imunológicos funciona como um indicador das condições de saúde e de como a doença evolui no organismo infectado. Os parâmetros analisados neste trabalho foram a contagem total de hemócitos (CTH) e o tempo de coagulação. A coleta dos animais foi feita na fazenda Compescal, em Aracati-CE. A amostragem dos camarões foi feita de forma direcionada em viveiros pré-selecionados na fazenda, ou seja, um viveiro em melhor estado e o outro em pior estado de ocorrência de mionecrose. Foram amostrados 15 camarões considerados sintomáticos e 15 assintomáticos por cada faixa de peso (4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10g). A contagem total de células e o tempo de coagulação obtiveram resultados estatisticamente diferentes, segundo ANOVA ($\alpha = 0,05$), tanto entre as diferentes faixas de peso, como também para os grupos sintomático e assintomático. Correlações foram encontradas entre peso e CTH e tempo de coagulação e CTH, a primeira positiva ($R=0,58$ e $0,65$ para os sintomáticos e os assintomáticos, respectivamente) e a segunda negativa ($R= -0,22$ e $-0,12$). Os resultados encontrados para o grupo de camarões assintomáticos, com valores mais altos de CTH e valores menores de tempo de coagulação, confirmam uma melhor condição desse grupo em combater o vírus presente no ambiente de cultivo. Ao contrário, o grupo dos camarões sintomáticos obteve um pior desempenho na análise imunológica, confirmando o fato destes serem camarões mais debilitados e com menor capacidade de reação do sistema imune.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Camarão infectado pelo MNV.....	5
Figura 2. Retirada de hemolinfa da região ventral do camarão.....	11
Figura 3. Acompanhamento do tempo de coagulação.....	12
Figura 4. Gráfico com as médias e desvios-padrão para o CTH das diferentes faixas de peso entre os grupos sintomático e assintomático.	14
Figura 5. Gráfico representativo do tempo médio de coagulação para as diferentes faixas de peso dos grupos sintomático e assintomático...	15

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1: Dados Comparativos da Carcinicultura Brasileira em 2004 e 2003.....	4
Quadro 2: Tipos e funções dos hemócitos.....	7
Quadro 3: Valores médios de CTH e tempo de coagulação para camarões sintomáticos e assintomáticos nas diferentes faixas de peso analisadas.....	15
Quadro 4: Resultados da análise de variância.....	15

AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei* (BOONE,1931) EM CULTIVOS COM OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA (IMNV).

ANDREZZA MELO COSTA

1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos ocorridos nas últimas décadas pela aqüicultura chamam a atenção do mundo para a potencialidade dessa atividade, a qual deve contribuir cada vez mais com a produção de alimentos e suprir a demanda de proteína animal que vem crescendo juntamente com a população global.

O produto mais importante da aqüicultura é o camarão marinho (ROCHA et al., 2004). Desta forma, em todo o mundo, a carcinicultura vem se desenvolvendo de forma bastante crescente nos âmbitos econômico e social, especialmente em países do Sudeste da Ásia, América Central e América do Sul. Porém, o ritmo de desenvolvimento nessas regiões tem diminuído nos últimos anos, em virtude principalmente da degradação ambiental e aparecimento de doenças de origem bacteriana e viral. Esses são fatores que progressivamente têm limitado o sucesso produtivo e econômico da atividade.

A intensificação da produção e o uso de manejos inadequados agravam essa situação, trazendo à tona vários problemas de ordem ecológica e de sanidade dos organismos cultivados, afetando a sustentabilidade dessa indústria em várias regiões de aglomeração de fazendas.

De acordo com Bachére (2000), o desenvolvimento de melhores manejos para a prevenção de doenças e qualidade de efluentes se tornou fundamental para garantir bons índices produtivos e, conseqüentemente, a continuidade da atividade. Ainda segundo esta autora, a durabilidade e o desenvolvimento sustentável da carcinicultura devem levar em conta o equilíbrio entre: I) a qualidade do meio ambiente; II) a prevenção de doenças; e

III) o estado de saúde do camarão. Os organismos aquáticos estão constantemente em contato com os microrganismos presentes na água, os quais podem atuar como patógenos oportunistas e agir quando os organismos se encontram estressados ou debilitados, quer seja por fatores de ordem física, química ou biológica (nutricionais ou infecciosos) (HENNIG et al., 1999; RAA et al., 1992).

Segundo Lightner (1992), há um interesse crescente no conhecimento dos mecanismos de defesa e do sistema imune de crustáceos devido à necessidade de se reduzir a atuação de patógenos e os seus efeitos. O conhecimento do sistema imunológico de camarões, especialmente os penéides, os quais representam mais de 95% dos camarões cultivados (SUBASINGHE et al., 1998), se torna cada vez mais essencial. Portanto, desenvolver técnicas de avaliação e monitoramento do estado de saúde de camarões cultivados, detectando condições anormais o quanto antes, pode ajudar muito na prevenção e no controle de doenças antes do seu estabelecimento, garantindo, dessa forma, a sobrevivência dessa atividade a longo prazo.

O acompanhamento de parâmetros imunológicos durante o cultivo pode funcionar como indicador do estado de saúde dos camarões (BARRACCO, 2004). Esses parâmetros são afetados rapidamente pela resposta do sistema imune frente a condições ruins, como nos casos de má qualidade da água ou manejo alimentar ineficiente. Essas condições debilitam os organismos cultivados, afetando o metabolismo, o crescimento e o processo de ecdise, e tendo como conseqüência o aumento da susceptibilidade destes animais a doenças infecciosas. Sem o acompanhamento desses parâmetros os problemas de saúde geralmente só conseguem ser detectados em um estágio já avançado, quando o crescimento dos camarões se compromete ou quando eles começam a aparecer mortos no viveiro.

O objetivo deste trabalho foi relacionar a quantidade de hemócitos e o tempo de coagulação da hemolinfa em camarões nas faixas de peso de 5 a 10 gramas e a susceptibilidade desses animais ao vírus do IMNV presente no ambiente de cultivo. Ao mesmo tempo pretendeu se verificar de que forma ocorre a proliferação das células diante de uma possível infecção pelo vírus presente nesse ambiente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)

As doenças do tipo viral são as que mais afetam a produção de camarões, ocasionando graves perdas nesta atividade. O Vírus da Mancha Branca, por exemplo, há alguns anos, devastou a produção de países de importância nesse mercado, como o Equador (CALDERÓN et al., 1999).

Em 2002 surgiu um novo vírus, o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), que afetou inicialmente fazendas do Estado do Piauí. A partir de 2003 essa doença se alastrou por praticamente todo o Nordeste, levando a uma queda acentuada na produção, de 2003 para 2004, e abalando a exportação de camarões brasileiros de forma substancial (RODRIGUES, 2005).

Como pode ser observado no Quadro 1, os estados mais afetados em diminuição do volume de produção foram os principais estados produtores (Rio Grande do Norte, Ceará e Piauí). Os estados que tiveram sua produção aumentada, provavelmente devido a um desenvolvimento da atividade nesses locais, não conseguiram evitar a queda da produção total. Segundo o técnico da ABCC Glauber Carvalho (comunicação pessoal), em 2005 a produção ficou em 70.000 toneladas, caindo ainda 7,78% em relação a 2004.

A doença causada pelo IMNV se desenvolve especialmente em condições de estresse ambiental, isto é, em condições de má qualidade da água.

Os camarões com essa enfermidade apresentam perda da transparência do músculo abdominal, a qual começa a partir do segundo ou terceiro segmento e vai se estendendo em direção ao telson (Figura 1). Com o avanço da doença, a cauda do camarão adquire aspecto leitoso, chegando a apodrecer no estágio mais avançado, com a liquefação dos músculos necrosados (aparência de camarão cozido). Outros sintomas do IMNV são: redução da atividade alimentar, dificuldade de endurecimento da carapaça ou carapaça "frouxa", natação errática e os animais podem apresentar intestino deformado (em forma de "S"). Além disso, os camarões passam a apresentar

uma curvatura rígida no músculo abdominal ("grampam"), o que ocorre facilmente durante manejo (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Esses mesmos autores informam que quando surgiu a doença os camarões só começavam a apresentar os sinais clínicos a partir de 7 gramas. Atualmente, até mesmo pós-larvas já podem apresentar esses sinais, sendo que surtos somente são observados em camarões em período de cultivo adiantado.

Os mesmos autores ainda citaram que nos cultivos afetados por esse vírus os camarões têm sua sobrevivência final diminuída de 20% a 50% sobre as taxas históricas, sendo que as mortalidades se acentuam ao longo dos ciclos subsequentes.

Quadro 1: Dados comparativos da carcinicultura brasileira por Estado entre os anos de 2003 e 2004.

ESTADO	Censo 2003	Censo 2004	VARIAÇÃO (%)
	PRODUÇÃO (ton)	PRODUÇÃO (ton)	
MA	706	226	-67,99
PA	324	242	-25,30
CE	25.915	19.405	-25,12
PI	3.309	2.541	-23,20
PE	5.831	4.531	-22,29
AL	130	102	-21,54
PR	390	310	-20,51
RN	37.437	30.807	-17,79
PB	3.323	2.963	-10,83
BA	8.211	7.577	-7,72
ES	370	370	0
SE	947	2.543	+168,53
RS	3	20	+566,67
TOTAL	90.190	75.904	-15,84

Fonte: RODRIGUES (2005) (modificado)



Figura 1: Camarão infectado pelo IMNV

2.2. Os Hemócitos

O sistema imune de crustáceos não é específico e não possui nenhuma capacidade de memória, portanto, ele não apresenta imunidade adquirida. Apesar disso, ele é considerado um sistema complexo, eficiente e altamente desenvolvido (SMITH, 1991).

Para manter a individualidade biológica do organismo, o sistema imune dos crustáceos faz uso de componentes humorais e celulares do sistema circulatório, os quais atuam em conjunto para a detecção e eliminação de agentes estranhos de seus tecidos que sejam potencialmente infecciosos. A patogenicidade do organismo invasor depende do grau de habilidade do hospedeiro em ativar seus mecanismos de defesa e combater o agente estranho (BARRACCO, 2004).

O sistema circulatório dos crustáceos é aberto, e as células deste sistema, os hemócitos, são análogas aos glóbulos brancos dos vertebrados (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; SÖDERHÄLL; SMITH, 1983; ROCH, 1999). A resposta inicial do sistema imune envolve o reconhecimento imediato de elementos estranhos por moléculas que interagem com os hemócitos e os ativa. Os hemócitos, portanto, atuam de forma essencial nas reações imunitárias, sendo também responsáveis por processos como fagocitose de

microrganismos invasores, a imobilização destes pela formação de nódulos, a encapsulação de microrganismos maiores, além de coagulação, citotoxicidade e produção de melanina pela ativação do sistema profenoxidase (proPO) (SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992).

O sistema proPO é uma cascata proteolítica que leva à síntese de melanina, gerando substâncias tóxicas que auxiliam na eliminação de microrganismos invasores (BARRACCO, 2004). Mais de 90% da atividade da enzima fenoxidase foi encontrada nos hemócitos do camarão *Farfantepenaeus paulensis* (PERAZZOLO; BARRACCO, 1997). Os hemócitos também sintetizam e liberam peptídeos com atividade antibacteriana e antifúngica (CHISHOLM; SMITH, 1992; DEXTOMIEUX et al., 1997), aglutininas e α 2-macroglobulinas (RODRIGUEZ et al., 1995). O conhecimento do comportamento dos diferentes tipos de hemócitos nestes processos proporciona a identificação da função de cada tipo celular e uma possível comparação com outras espécies de crustáceos.

Segundo Bauchau (1981), existem três tipos de hemócitos presentes na hemolinfa de crustáceos: os hemócitos hialinos, os semigranulares e os granulares. As funções de cada tipo celular encontra-se no Quadro 2.

De acordo com critérios morfológicos, os hemócitos diferem entre si pelo tamanho, estrutura e granularidade (SEQUEIRA et al., 1995). Os hemócitos hialinos são células pequenas, quando comparadas às granulares (5-14 μm de comprimento x 4-7 μm de largura), de formato oval, circular ou fusiforme, possuem citoplasma delgado e basófilo, um núcleo grande (3-7 μm) e central, ocupando quase toda a célula, ausência de grânulos e presença de depósitos de glicoproteínas (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; LE MOULLAC et al., 1997; GARGIONI; BARRACCO, 1998; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

Os hemócitos semigranulares são células maiores (9-18 μm de comprimento x 6-8 μm de largura), de formato ovóide ou fusiforme, apresentam núcleo pequeno (3-4 μm) e esférico, e ocorre a presença de numerosos pequenos grânulos arredondados. Os hemócitos granulares são células grandes (9-18 μm de comprimento x 7-10 μm de largura), de formato circular ou ovóide, apresentam somente grânulos grandes (maiores que os encontrados nos semigranulares), os quais preenchem quase que totalmente o citoplasma, podendo até encobrir o núcleo. Além disso, possuem alta relação núcleo-

citoplasma e apresentam inclusões e ribossomos livres no citoplasma (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; LE MOULLAC et al., 1997; GARGIONI; BARRACCO, 1998; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003).

Quadro 2: Tipos e funções dos hemócitos.

TIPO DE HEMÓCITO	FUNÇÕES	REFERÊNCIAS
HIALINO	Fagocitose em algumas espécies de caranguejos e lagostins;	SÖDERHÄLL; CERENIUS (1992).
	Coagulação.	OMORI; MARTIN; HOSE, (1989).
SEMIGRANULAR	Reconhecimento de partículas estranhas e ativação do sistema proPO;	JOHANSSON; SÖDERHÄLL (1985).
	Fagocitose;	BACHÈRE; MIALHE; RODRIGUEZ (1995); GARGIONI; BARRACCO (1998).
	Citotoxicidade;	SÖDERHÄLL et al.(1985).
	Encapsulação;	BACHÈRE et al.(1995).
	Liberação de peneidinas e peptídeos antimicrobianos.	DESTOUMIEUX et al. (2000).
GRANULAR	Estocagem e liberação do sistema proPO;	BACHÈRE et al. (1995).
	Fagocitose;	GARGIONI; BARRACCO (1998); HOSE; MARTIN (1989).
	Formação de nódulos e cápsulas e produção de substâncias tóxicas e microbicidas;	HOSE; MARTIN; GERARD (1990); VAN DE BRAAK et al. (2002b).
	Síntese e armazenagem de peneidinas.	DESTOUMIEUX et al. (2000).

Quanto à refração no microscópio de contraste de fases, os hialinos não apresentam refração, enquanto que os granulares são bastante

refratados, dificultando a observação do núcleo. Os semigranulares têm refratância moderada (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; GARGIONI; BARRACCO, 1998; LE MOULLAC et al., 1997; RENDÓN; BALCÁZAR, 2003). As similaridades morfológicas e funcionais entre os hemócitos semigranulares e granulares e a ocorrência de formas de transição entre estes tipos celulares, levam a crer que eles sejam diferentes estágios de desenvolvimento de uma mesma linha celular (GARGIONI; BARRACCO, 1998).

Nos hemócitos granulares, substâncias como peroxinectina, lipopolissacarídeos e proteína fixadora de β -glucanos, fazem com que eles reconheçam microrganismos ou parasitas como estranhos e liberem as enzimas que constituem o sistema proPO por exocitose, além de uma série de proteínas que estimulam os processos de fagocitose, encapsulação e coagulação. Essa liberação também ocorre com hemócitos semigranulares, mas em um nível menor (SMITH; SÖDERHÄLL, 1983; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1998).

A presença dessas substâncias estimulantes também pode causar a proliferação de hemócitos, como visto em *Marsupenaeus japonicus* quando estimulados com lipopolissacarídeos (LPS) (SEQUEIRA; TAVARES; ARALACHAVES, 1996). O contato com substâncias como os LPS e beta-glucanos ativam as funções celulares de defesa, inclusive a coagulação (VARGAS-ALBORES; YEPIZ-PLASCENCIA, 2000).

2.3. Contagem de Hemócitos

Dentre os parâmetros imunológicos, o hemograma, o qual consiste nas contagens total e diferencial de hemócitos (CTH e CDH, respectivamente), é um dos parâmetros mais afetados por condições de estresse, quer seja ambiental, ou por infecções, ou pelo período de ecdise (muda), servindo, portanto, como um indicativo do estado de saúde do animal (PERAZOLLO et al., 2002; SMITH; SÖDERHÄLL, 1983; TSING; ARCIER; BREHELIN, 1989). O hemograma avalia a proporção e o número de hemócitos presentes no plasma e permite verificar o efeito dos fatores ambientais ou condições de manejo que

possam levar a um estado de estresse ou deficiência imunológica (BACHÈRE; MIALHE; RODRIGUEZ (1995).

Em situação constante de baixos níveis de oxigênio dissolvido na água e níveis elevados de amônia, por exemplo, o CTH é diminuído e a atividade fagocítica se torna menos eficiente, levando a um aumento da sensibilidade a patógenos. Durante condições de hipoxia o número de células diminui, provavelmente em conseqüência da imobilização destas na região das brânquias (CHENG *et al.*, 2002; LE MOULLAC *et al.*, 1998; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000). Reduções na salinidade também diminuem o número de hemócitos, mas nesse caso em algumas semanas os valores tendem a se normalizar (PERAZZOLO *et al.*, 2002). A atividade mitótica do tecido hematopoiético, isto é, a produção de hemócitos, também é reduzida em temperaturas mais baixas (LE MOULLAC & HAFFNER, 2000).

Em um desafio contra o Vírus da Mancha Branca (WSSV) realizado em famílias consideradas resistentes e famílias consideradas susceptíveis da espécie *Litopenaeus vannamei*, ocorreu uma grande variação tanto do número total de hemócitos, como na proporção entre os tipos de hemócitos, obtendo como resultado uma rápida proliferação das células nas famílias resistentes, o que não aconteceu na mesma intensidade com famílias consideradas susceptíveis. A rápida proliferação de hemócitos comprovaria a característica de resistência da primeira família (MALDONADO *et al.*, 2003).

Sequeira, Tavares e Arala-Chaves (1996) evidenciaram a proliferação de hemócitos livres no citoplasma, ou seja, fora do tecido hematopoiético, como sendo um estímulo causado pelo reconhecimento do não próprio pelas células circulantes. Segundo esses autores, esse comportamento parece estar associado a um mecanismo compensatório dos hemócitos na medida em que ocorrem perdas quando estes se envolvem na defesa do organismo na presença de um agente patógeno.

2.4. Sistema de Coagulação

O fato dos crustáceos apresentarem circulação aberta torna o sistema de coagulação um dos mais importantes mecanismos de defesa para esses animais, pois este sistema impede a perda excessiva de hemolinfa e a disseminação de patógenos para dentro do organismo (BARRACCO, 2004). No ponto de coagulação (local do ferimento) ocorre uma agregação de hemócitos, os quais formam uma barreira até a constituição de uma nova cutícula (BAUCHAU, 1981). A rapidez e a eficiência na formação da barreira (tempo de coagulação) devem resultar numa melhor sobrevivência dos animais quando em contato com agentes patógenos (THEOPOLD et al., 2004).

Em análises presuntivas o tempo de coagulação é um procedimento bastante utilizado, sendo o tempo de 20 segundos tido como padrão para este tipo de análise, funcionando como o limite de tolerância para camarões sadios (PEREGRINO, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta dos Animais

Os camarões usados nesse estudo foram coletados na fazenda COMPESCAL (Comércio de Pescado Aracatiense LTDA), localizada no município de Aracati, Estado do Ceará, no período de 12 a 16 de setembro de 2005. Para esta coleta foram selecionados diferentes viveiros apresentando camarões com pesos nas faixas de 5, 6, 7, 8, 9 e 10 gramas. Dentro de cada faixa de peso foram selecionados um viveiro que apresentasse mais camarões com sinais clínicos de IMNV (sintomáticos) e outro que apresentasse menos camarões com esses sinais (assintomáticos). Em cada viveiro foram coletados 15 animais, totalizando 30 camarões por faixa de peso. Foram, portanto, coletados 180 camarões de 12 viveiros (dois viveiros para cada faixa de peso).

Os camarões foram coletados com tarrafa, selecionados segundo o grau de sanidade e levados em baldes com água para o laboratório de análises da própria fazenda.

3.2. Coleta da Hemolinfa para a Contagem Total de Células

No laboratório da fazenda os camarões foram mantidos nos baldes sob aeração e a coleta da hemolinfa foi feita logo em seguida. Para esta coleta foram utilizadas seringas de 1 ml acrescidas de 0,05 ml de solução tamponada Tris-HCL 1M (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,25M; Citrato de Sódio 0,1M; pH 7,6 e formalina a 5%), usada como anticoagulante na proporção de 1:1, isto é, 0,05 ml de anticoagulante para cada 0,05 ml de hemolinfa retirada. A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo no início do primeiro segmento abdominal (Figura 2). O material foi colocado em tubos de Eppendorf e mantido sob refrigeração (HENNIG *et al.*, 1999).

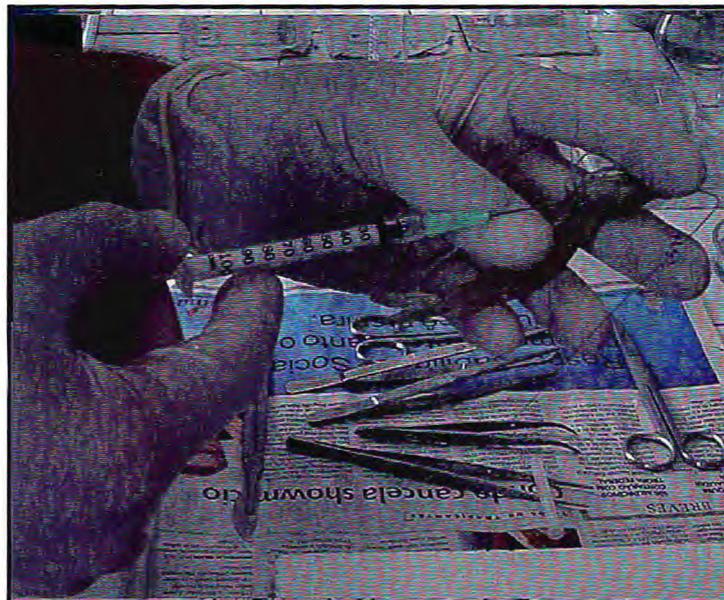


Figura 2: Retirada de hemolinfa da região ventral do camarão.

3.3. Medida do Tempo de Coagulação da Hemolinfa

Para todo camarão o qual foi retirada a amostra de hemolinfa com o anticoagulante, o mesmo era submetido a mais uma retirada com outra seringa sem anticoagulante para a análise do tempo de coagulação. Neste procedimento foi extraída uma pequena quantidade de hemolinfa e colocada sob uma lâmina, onde, com a ponta da agulha da seringa a amostra coletada era esfregada contra a lâmina até que houvesse a coagulação (Figura 3). O tempo era determinado com a ajuda de um cronômetro.



Figura 3: Acompanhamento da coagulação da hemolinfa.

3.4. Contagem do Número Total de Células

A contagem total das células (CTH) foi feita no laboratório do CEDECAM (Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Camarão Marinho) no LABOMAR (Instituto de Ciências do Mar), em Fortaleza. O transporte do material da fazenda ao laboratório foi feito em caixas de isopor com gelo para a manutenção da temperatura. Ao chegar ao CEDECAM, as amostras foram acondicionadas em geladeira.

Para a análise as amostras foram diluídas com a solução tamponada anteriormente citada segundo a quantidade de hemócitos da amostra (diluição de 4 a 6 vezes).

No momento da contagem, sub-amostras foram colocadas numa câmara de Neubauer (hemocitômetro), uma de cada vez, e analisadas ao microscópio óptico comum. O procedimento para a contagem total de hemócitos é semelhante àquela usado para a contagem de células sanguíneas humanas.

3.5. Análises Estatísticas

Os dados referentes às contagens e tempo de coagulação foram organizados em planilhas eletrônicas e posteriormente submetidos a análises de variância (ANOVA) e correlação ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

Neste estudo, a contagem total de células (CTH) do grupo dos camarões assintomáticos se manteve quase sempre maior em comparação ao grupo dos camarões sintomáticos, como pode ser observado na Figura 4. Somente nas faixas de peso de 5 e 8 gramas o valor médio do CTH foi maior para o grupo sintomático. Já o desvio-padrão se manteve relativamente alto, porém com valores aproximados entre os dois grupos gerais estudados.

O CTH obteve resultados estatisticamente diferentes, segundo ANOVA ($\alpha = 0,05$), tanto entre as diferentes faixas de peso, como também para os grupos sintomático e assintomático.

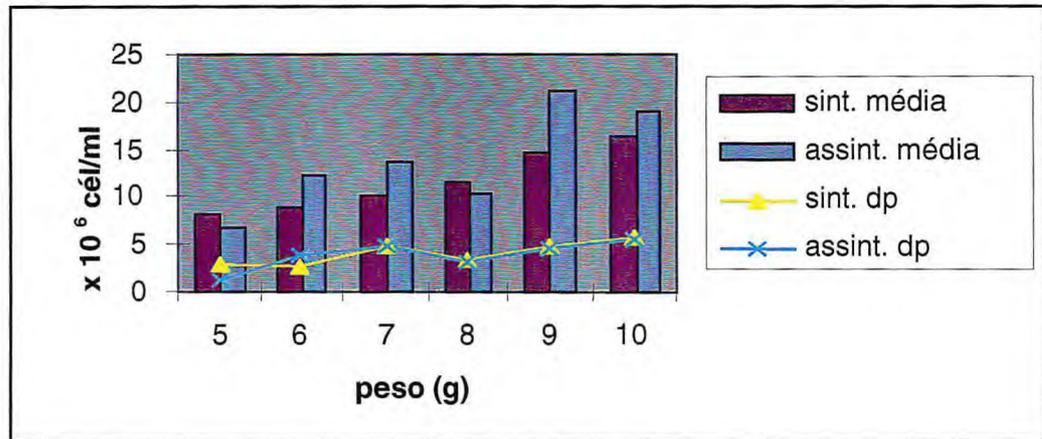


Figura 4: Gráfico com as médias e desvios-padrão (dp) para o CTH das diferentes faixas de peso entre os grupos sintomático e assintomático.

Para o tempo de coagulação, o grupo dos camarões sintomáticos apresentaram valores maiores com relação ao grupo dos assintomáticos, com exceção para os camarões na faixa de 9 gramas. Para os dois grupos estudados, seus valores foram considerados estatisticamente diferentes em todas as faixas de peso (ANOVA, $\alpha = 0,05$). Valores mais altos foram observados para as faixas de 5, 7 e 8 gramas. Após a faixa de 8 gramas houve uma queda bastante acentuada dos valores no grupo dos camarões sintomáticos, passando inclusive a ficar menor que o grupo dos assintomáticos na faixa de 9 gramas, mas com um posterior aumento na faixa de 10 gramas (Figura 5).

O número total de células aumentou progressivamente com o aumento de peso (Quadro 3), tendo sido encontrada uma correlação direta relativamente alta ($R=0,58$ e $0,65$ para os sintomáticos e os assintomáticos, respectivamente) entre peso e CTH. Já com relação ao tempo de coagulação, não foi encontrado nenhum padrão relacionado ao peso dos camarões, tendo sido encontrado somente uma correlação negativa ($R= -0,22$ para os camarões sintomáticos) entre CTH e tempo de coagulação, significativa para $n= 90$ (R crítico $\cong 0,20$).

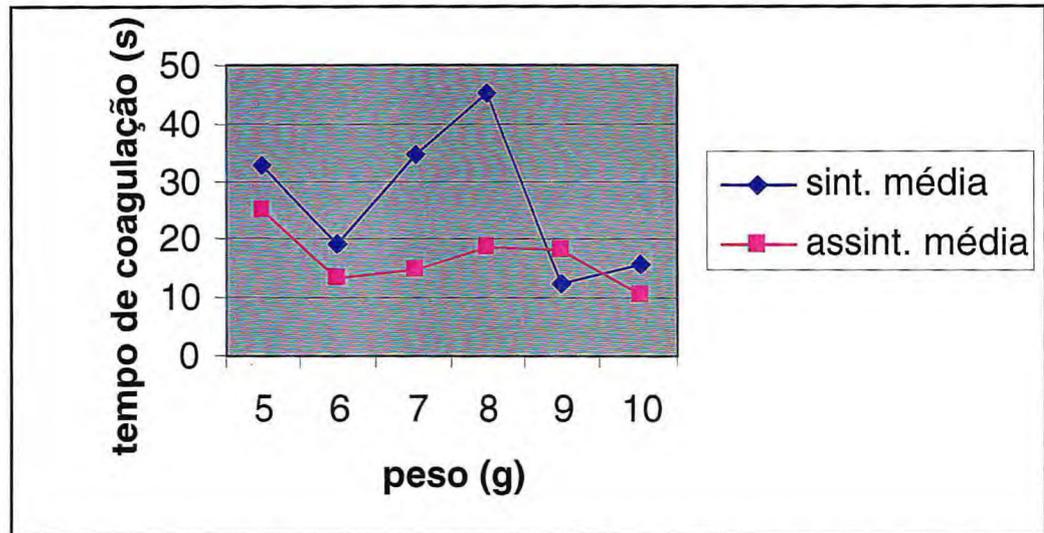


Figura 5: Gráfico representativo do tempo médio de coagulação para as diferentes faixas de peso dos grupos sintomático e assintomático.

Com relação aos dois tipos de análise, CTH e tempo de coagulação, os valores do F calculado para o CTH foram maiores que os valores do F para o tempo de coagulação, em comparação aos valores críticos (Quadro 4).

Quadro 3: Valores médios de CTH e tempo de coagulação para camarões sintomáticos e assintomáticos nas diferentes faixas de peso analisadas.

Faixas de Peso (g)	CTH ($\times 10^6$ cél/ml)		Tempo de coagulação (s)	
	Sint.	Assint.	Sint.	Assint.
5 ─ 5,99	8,23 \pm 2,90	6,84 \pm 1,25	32,73 \pm 18,75	24,87 \pm 10,52
6 ─ 6,99	8,78 \pm 2,64	12,27 \pm 3,82	19,33 \pm 10,33	13,67 \pm 6,14
7 ─ 7,99	10,20 \pm 4,75	13,60 \pm 4,87	34,67 \pm 38,35	14,73 \pm 6,37
8 ─ 8,99	11,64 \pm 3,41	10,26 \pm 3,16	45,07 \pm 47,50	18,67 \pm 9,48
9 ─ 9,99	14,70 \pm 4,79	21,24 \pm 4,45	12,27 \pm 6,18	18,04 \pm 26,17
10 ─ 10,99	16,34 \pm 5,77	18,89 \pm 5,43	16,00 \pm 11,57	10,47 \pm 2,88

Quadro 4: Resultados da análise de variância.

Fonte de Variação	CTH	Tempo de coagulação	GL	F crit.
	F calc.			
Sint./ Assint.	12,50	9,81	1	3,24
Faixas de peso	22,69	4,05	5	2,21
Interação	4,33	2,25	5	2,21

5. DISCUSSÃO

Neste estudo, o CTH do grupo dos camarões assintomáticos se manteve quase sempre maior em comparação ao grupo dos camarões sintomáticos, demonstrando provavelmente uma melhor reação e uma maior resistência daquele grupo diante da presença do vírus no ambiente. Já os valores mais baixos de CTH apresentados pelos camarões sintomáticos podem indicar uma menor capacidade de reação hemocitária deste grupo diante da doença. Essa aparente menor capacidade pode ser resultado tanto de uma menor eficiência imunológica, fator este de ordem fisiológica e/ ou genética, como também pode resultar de condições mais desfavoráveis de cultivo, que implicariam em uma situação de estresse mais agravante a qual estaria submetido este grupo.

Valores baixos de CTH resultam em uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas, e períodos prolongados nessa situação levam a uma depleção do sistema imune, o que aumenta o risco de infecções tanto por microrganismos patogênicos como por microrganismos oportunistas (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; PERAZZOLO et al., 2002). Ao contrário, uma maior quantidade de hemócitos presentes na circulação confere uma maior resistência a patógenos (LE MOULLAC et al., 1998).

Persson, Cerenius e Söderhäll (1987) apontaram um aumento na susceptibilidade a infecção após uma redução experimental (induzida) do número de hemócitos em *Pacifastacus leniusculus*, indicando o importante envolvimento destas células no reconhecimento do não-próprio. Com menos hemócitos circulantes o sistema de defesa fica debilitado e os animais sucumbem aos agentes patógenos, gerando processos infecciosos.

Durante infecções, os valores de CTH tendem primeiramente a diminuir, devido à migração das células para os tecidos infectados, ou à explosão celular (pela produção de espécies ativas de oxigênio nos processos de fagocitose), ou ainda devido a apoptose induzida pelo vírus. A resposta imunológica a curto prazo é, portanto, a diminuição do CTH. Após o período inicial de diminuição, ocorre um aumento do número de hemócitos, resultantes da produção de novas células pelo tecido hematopoiético ou pelas próprias

células circulantes. Esse aumento no CTH traria como conseqüência um aumento de efetores imunológicos e, portanto, da capacidade do hospedeiro em combater a infecção. Porém, o aumento ou a diminuição dos valores de CTH depende diretamente do tempo a que os animais estão submetidos aos fatores estressantes e infectológicos (BARRACCO, 2004; HENNIG et al., 1998; JIRAVANICHPAISAL et al., 2001; VAN DE BRAAK et al., 2002b).

Valores mais altos do CTH resultaram numa melhora da capacidade imunológica dos animais frente à presença do vírus IMNV no ambiente. Nos camarões assintomáticos, isto é, nos camarões que não apresentavam sintomas diante da presença do vírus, um número geralmente maior de hemócitos sugere um maior grau de ativação dos mesmos contra os processos infecciosos. Portanto, para um bom funcionamento dos fatores celulares de defesa é importante não só a quantidade de hemócitos presentes na circulação, mas também a intensidade de resposta ao primeiro estímulo, resultando em uma proliferação adequada para a manutenção de níveis ideais do número de hemócitos e grau de ativação das células (MALDONADO et al., 2003).

Por dois momentos o grupo dos camarões assintomáticos das faixas de 5 e 8 gramas apresentaram valores de CTH menores que os dos camarões sintomáticos. Esse resultado pode indicar possíveis picos de atividade viral no ambiente, o que resultaria num maior gasto de hemócitos para combater a infecção, ou ainda um aumento do nível de estresse dos animais com relação a outros fatores ambientais presente no cultivo naquele momento.

Na maioria dos casos a diminuição do CTH está associada a uma diminuição significativa de hemócitos hialinos, enquanto o aumento se deve a maior proliferação de hemócitos granulares e agranulares (LE MOULLAC et al., 1997; LE MOULLAC et al., 1998).

Dados na literatura sobre tempo de coagulação são escassos, devido principalmente a este ser um procedimento de campo utilizado para monitorar o estado de saúde dos animais. Normalmente os fatores que influenciam o número de hemócitos também influenciam no tempo de coagulação. Neste trabalho os camarões que apresentavam sintomas da mionecrose geralmente também apresentavam um maior tempo de coagulação em comparação ao

grupo dos camarões assintomáticos. Para este último, os valores se mantiveram baixos e próximos, ao longo das faixas de peso.

Num estudo feito com camarões infectados com WSSV o tempo de coagulação aumentou significativamente no grupo de camarões infectados, havendo inclusive grupos em que não ocorreu coagulação após 36 horas após o início do processo infeccioso experimental (YOGANANDHAN; THIRUPATHI; HAMEED, 2003).

O tempo de coagulação utilizado como padrão para camarões sadios é de 20 segundos (PEREGRINO, 2005). Dessa forma, o grupo dos camarões sintomáticos obteve o maior número de faixas de peso acima desse limite, onde o pico aconteceu na faixa de 8 gramas com um tempo de 45 segundos.

Não foram encontrados dados na literatura que correlacione CTH e tempo de coagulação. A pequena correlação negativa entre estes dois parâmetros encontrada neste trabalho (nos camarões sintomáticos) pode indicar que uma menor quantidade de hemócitos na circulação prejudicaria os processos de coagulação, aumentando o tempo de exposição dos organismos em casos de injúria. Esta situação resultaria numa menor capacidade do sistema de defesa em proteger os organismos contra patógenos presentes no meio.

Também foi encontrada correlação, nesse caso positiva, entre peso e CTH. Essa correlação deixa claro que quanto maior o animal e mais volume corporal ele contém, maior é a quantidade de células presentes nesse fluido.

Entre os dois parâmetros analisados, CTH e tempo de coagulação, os resultados estatísticos do ANOVA, isto é, os valores do F calculado, foram bem maiores para o CTH com relação aos valores críticos do que os resultados para o tempo de coagulação, mostrando uma maior intensidade de resposta daquele parâmetro do que este último na análise imunológica. Isso dá respaldo ao fato de o CTH ser considerado um dos parâmetros mais sensíveis diante do estado de saúde do animal (PERAZOLLO et al., 2002; SMITH; SÖDERHÄLL, 1983; TSING; ARCIER; BREHELIN, 1989). Entretanto, o tempo de coagulação também se mostrou bastante aplicável para estudos imunológicos.

Valores relativamente altos de desvio padrão em todos os grupos e faixas estudados provavelmente se devem aos diferentes fatores ambientais e

fisiológicos a que os camarões estão sujeitos diante de condições não controladas, como no caso dos viveiros.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados para o grupo de camarões assintomáticos, com valores mais altos de CTH e valores menores de tempo de coagulação, confirmam uma melhor condição desse grupo em combater o vírus presente no ambiente de cultivo. Em outras palavras, o grupo dos camarões assintomáticos, devido a um melhor estado do sistema imune, conseguiu resistir melhor à presença do vírus e, dessa forma não desenvolveu sinais clínicos da doença. Ao contrário, o grupo dos camarões sintomáticos obteve um pior desempenho na análise imunológica, confirmando o fato destes serem camarões mais debilitados e com menor capacidade de reação do sistema imune.

Quanto à correlação negativa encontrada entre CTH e tempo de coagulação no grupo dos camarões sintomáticos, há necessidade de mais estudos a respeito deste aspecto, já que para os camarões assintomáticos não foi encontrada correlação neste trabalho.

7. RECOMENDAÇÕES

Os resultados desse trabalho dão subsídio à importância do monitoramento e da manutenção de um bom estado imunológico dos camarões em ambiente de cultivo. Portanto, o desenvolvimento de técnicas de análises imunológicas para serem aplicadas em programas de cultivo, poderia proporcionar meios de fazer um acompanhamento da eficiência de resposta do sistema imune frente a doenças e outras condições de estresse, tornando possíveis avaliações periódicas do estado de saúde dos animais cultivados.

Na medida em que a seleção e a obtenção de camarões mais resistentes se tornam cada vez mais cruciais para a sustentabilidade da carcinicultura, a busca por formas de melhoramento do sistema imune, através do uso de imunoestimulantes e melhoramento genético, requer o desenvolvimento de pesquisas em imunologia, de forma a obter valores padrões para os parâmetros utilizados nas análises imunológicas diante de situações presentes nos cultivos, como foi no caso deste trabalho, a presença do IMNV.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACHÈRE, E.; MIALHE E.; RODRIGUEZ, J. Identification of defense effectors in the haemolymph of Crustaceans with particular reference to the shrimp *Penaeus japonicus* (Bate): prospects and applications. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 5, p. 597-612, 1995.

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

BARRACCO, M. A. Mecanismos de resistência a doenças em crustáceos. **Sanidade de organismos aquáticos**, Ed. Varela, p. 51-74, 2004.

BAUCHAU, A. Invertebrate blood cells. **Crustaceans**, Academic Press, p 386-420, 1981.

CALDERÓN, J.; BAYOT, B.; BETANCOURT, I.; ALDAY DE GRAINDORGE, V. Monitoreo del virus de la mancha blanca en Ecuador. **El Mundo Acuícola**, v. 5, p. 211-214, 1999.

CHENG, W.; LIU, C. H.; HSU, J. P.; CHEN, J. C. Effect of hypoxia on the immune response of freshwater giant prawn *Macrobrachium rosenbergii* and its susceptibility to pathogen *Enterococcus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 13, p. 351-365, 2002.

CHISHOLM, J. R. S.; SMITH, V. J. Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab *Carcinus maenas*. **Journal of Marine Biology**, v. 72, p. 529-542, 1992.

DESTOUMIEUX, D.; BULET, P.; LOEW, D.; VAN DORSSELAER, A.; RODRIGUEZ, J.; BACHÈRE, E. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vanammei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 28398- 28406, 1997.

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

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

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

HENNIG, O. L.; VASCONCELOS, T. C.; ANDRADE, T. P.; CARVALHO, R. L.; CAVALCANTE, F. A. M.; ARAÚJO, P. H. G.; MARTINS, P. C. C.; MARQUES, L. C. Avaliação da contagem total de hemócitos (CTH) na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) cultivado em diferentes salinidades. **Anais do XI CONBEP e do I CONLEAP - Recife**, v. 2, p. 589-593, 1999.

HOSE, J. E.; MARTIN, G. G. Defense functions of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* Burkenroad 1938. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 335-346, 1989.

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

JIRAVANICHPAISAL, P.; BANGYEEKHUN, E.; SÖDERHÄLL, K.; SÖDERHÄLL, I. Experimental infection of white spot syndrome virus in freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 151-157, 2001.

JOHANSSON, M. W.; SÖDERHÄLL, K. Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. **Journal of Comparative Physiology**, v. 156, p. 175-181, 1985.

LE MOULLAC, G.; LE GROUMELEC, M.; ANSQUER, D.; FROISSARD, S.; LEVY, P. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 7, p. 227-234, 1997.

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 and Shellfish Immunology**, v. 8, p. 621-629, 1998.

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

LIGHTNER, D. V. Shrimp virus diseases: Diagnosis, distribution and management. **Proceedings of the Special Session on Shrimp Farming**, World Aquaculture Society, p. 238-253, 1992.

MALDONADO, M.; RODRÍGUEZ, J.; BLAS, I.; ECHEVERRIA, F. Comportamiento hemocitario en familias de *Litopenaeus vannamei* desafiadas al WSSV. **CIVA 2003**, p. 891-899, 2003.

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

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

PERAZZOLO, L. M.; BARRACCO, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 21, n. 5, p. 385-397, 1997.

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

PEREGRINO, L. H. Importância da utilização de análises presuntivas como ferramenta de prevenção e controle de enfermidades no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, Ano 7, n. 3, p. 47-51, 2005.

PERSSON, M.; CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The influence of haemocyte number on the resistance of the freshwater crayfish, *Pacifastacus leniusculus* Dana, to the parasitic fungus *Aphanomices astaci*. **Journal of Fish Diseases**, v. 10, p. 471-477, 1987.

RAA, J.; ROBERSTAD, G.; ENGSTAD, R.; ROBERTSEN, B. The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organisms to microbial infections. **Diseases in Asian Aquaculture**, Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 39-50, 1992.

RENDÓN, L.; BALCÁZAR, J. L. Immunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. **Revista AquaTIC**, n. 19, p. 27-33, 2003.

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

ROCHA, I. R. C. B.; LIMA, F. M.; GONÇALVES, F. A.; SAMPAIO, A. H.; COSTA, F. H. F. Las camaronerías de *Litopenaeus vannamei* em el estado de

Ceará (Brasil): la problemática ambiental. **Comunicación Científica CIVA 2004**, p. 680-688, 2004.

RODRIGUES, J. Carcinicultura marinha – desempenho em 2004. **Revista da ABCC**, Ano 7, n. 2, p. 38-44, 2005.

RODRÍGUEZ, J.; BOULO, V.; MIALHE, E.; BACHÈRE, E. Characterization of shrimp haemocytes and plasma components by monoclonal antibodies. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 1043-1050, 1995.

SEQUEIRA, T.; VILANOVA, M.; LOBO-DA-CUNHA, A.; BALDAIA, L.; ARALA-CHAVES, M. Flow cytometric analysis of molt-related changes in haemocytes types in male and female *Penaeus japonicus*. **Biological Bulletin**, v. 189, p. 376-380, 1995.

SEQUEIRA, T.; TAVARES, D.; ARALA-CHAVES, M. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 20, n. 2, p. 97-104, 1996.

SMITH, V. J. Invertebrate Immunology: phylogenetic, ecotoxicological and biomedical implications. **Comparative Haematology International**, v. 1, p. 61-76, 1991.

SMITH, V. J.; SÖDERHÄLL, K. β -1,3- glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. **Biological Bulletin**, v. 164, p. 299-314, 1983.

SÖDERHÄLL, K.; WINGREN, A.; JOHANSSON, M. W.; BERTHEUSSEN, K. The cytotoxic reaction of hemocytes from freshwater crayfish, *Astacus astacus*. **Cell Immunology**, n. 94, p. 326-332, 1985.

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

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

SÖDERHÄLL, K.; SMITH, V. J. Separation of haemocyte population of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 7, p. 229-239, 1983.

SUBASINGHE, R. P.; BARTLEY, D. M.; MCGLADDERY, S.; BARG, U. Sustainable shrimp culture development: biotechnological issues and challenges. **Advances in Shrimp Technology**, BIOTEC, p. 13-18, 1998.

THEOPOLD, U.; SCHMIDT, O.; SÖDERHÄLL, K.; DUSHAY, M. S. Coagulation in arthropods: defense, wound closure and healing. **Trens in Immunology**, v. 25, p. 289-294, 2004.

TSING, A.; ARCIER, J. M.; BREHELIN, M. Haemocytes of penaeid and palaemonid shrimps, morphology, cytochemistry and haemograms. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 53, p. 64-77, 1989.

VAN DE BRAAK, C. B. T.; BOTTERBLOM, M. H. A.; LIU, W.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; ROMBOUT, J. H. W. M. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 12, p. 253-272, 2002b.

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

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