



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

LUÍS PAULO ARAÚJO LAGE

AVALIAÇÃO DOS IMUNOPARÂMETROS DO CAMARÃO BRANCO
Litopenaeus vannamei **SUBMETIDO A BANHOS DE IMERSÃO COM**
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Spirulina platensis*

FORTALEZA – 2011

LUÍS PAULO ARAÚJO LAGE

**AVALIAÇÃO DOS IMUNOPARÂMETROS DO CAMARÃO BRANCO
Litopenaeus vannamei SUBMETIDO A BANHOS DE IMERSÃO COM
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Spirulina platensis***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca.

Área de concentração: Recursos Pesqueiros.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias

FORTALEZA – 2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- L171a Lage, Luis Paulo Araújo.
Avaliação dos imunoparâmetros do camarão branco *Litopenaeus vannamei* submetido a banhos de imersão com polissacarídeos sulfatados de *Spirulina platensis* / Luis Paulo Araújo Lage. – 2011.
65 f. : il., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2011.
Área de Concentração: Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros.
Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.
1. Carcinicultura. 2. Spirulina. 3. Polissacarídeos. 4. Camarão. I. Título.

LUÍS PAULO ARAÚJO LAGE

**AVALIAÇÃO DOS IMUNOPARÂMETROS DO CAMARÃO BRANCO
Litopenaeus vannamei SUBMETIDO A BANHOS DE IMERSÃO COM
POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE *Spirulina platensis***

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^ª. Dra. Célia Maria de Sousa Sampaio
Universidade Estadual do Ceará - UECE

Prof. PhD. Rodrigo Maggioni
Universidade Federal do Ceará - UFC

AGRADECIMENTOS

A todos que de forma direta ou indireta participaram na conclusão deste trabalho.

A muito ao meu orientador professor Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias, que em todos os momentos de dúvidas estava sempre disposto a esclarecê-las, como também os muitos ensinamentos que me foram passados ao longo destes vários anos.

A todos os integrantes dos laboratórios de Planctologia e Biomar – Lab. pela parceria em todas as horas e quem sem a ajuda dessa galera tudo seria ainda bem mais difícil (Alan Coelho, Carla Carolyne, Glacio Araujo, Jefferson Saboya, João Henrique Bezerra, Jose Junior, Jose William, Mario Barros, Nara Nunes, Pedro Henrique Gomes, Renato Teixeira, Regisvanio Nascimento, Sara Monaliza Nogueira). Desculpa por deixar de citar alguém.

As professoras Dra. Luciane Perazzolo e a Dra. Margherita Barracco a oportunidade de estagio no Laboratório de Imunologia Aplicada a Aquicultura – LIAA (UFSC), a atenção e os conhecimentos transmitidos que foram muito importantes para a realização deste trabalho. Duas grandes mulheres que tenho um carinho especial. E aos novos amigos de Florianópolis.

Ao Hudson Lucena (Eng. de Pesca da COMPESCAL) pela parceria e contribuição na realização do trabalho.

Em especial ao Mestre Zé (Encarregado da Fazenda Aquisa) que sempre foi solicitado me atendeu prontamente.

Aos professores Silvana Saker e Alexandre Sampaio.

A coelhinha KASSANDRA... e ao pessoal do BioMol-LAB (Suzete Roberta e Raquel Benevides).

Aos meus amigos de curso (Kelma Pires, Lorena Monteiro, Márcia Barbosa, Tidy Lima, etc.) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Eng. de Pesca – UFC.

À secretaria do programa (Rogéria Setúbal) e ao coordenador (Porf. Celso Nagano).

A todos da minha família que sempre me apoiaram e todo o carinho especial – tia Maria Iara (Lála).

Em especial a minha mãe Neyara Araujo que é simplesmente uma pessoa MARAVILHOSA.

Ao meu pai Paulo César Lage e minhas irmãs Yara Lage e Neyara Lage por toda a ajuda.

A todos os meus amigos de praia, de bar, de viagens e também aqueles nos momentos de aprendizagem.

À CAPES pelo auxílio da bolsa e financiamento do projeto PROCAD/CAPES.

Agradeço a todos....

RESUMO

A aquicultura é uma das atividades produtoras de alimento que mais cresce a nível mundial e o cultivo de camarões marinhos apresentou a maior taxa de crescimento média nos últimos 50 anos. A busca por produção, muitas vezes, requer um incremento na densidade utilizada, levando os indivíduos cultivados a condições de estresse e ao surgimento de doenças oportunistas. O uso de imunostimulantes na aquicultura, entre eles os polissacarídeos sulfatados (PS), tem resultado em um aumento na resistência dos animais a patógenos e a situações de estresse. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos PS de *Spirulina platensis* em pós-larvas (PL's) e juvenis do camarão branco *Litopenaeus vannamei*, por meio de banhos de imersão. A administração do PS para as PL's de *L. vannamei* foi realizada nas concentrações de 0 (controle); 50; 100 e 200 mg L⁻¹, duas horas antes da avaliação da resistência das mesmas ao teste do estresse salino. Os juvenis de *L. vannamei* foram expostos, durante três horas, aos PS de *S. platensis* nas concentrações de 0 (controle); 60; 120 e 240 mg L⁻¹ seguida da coleta da hemolinfa para a análise dos seguintes imunoparâmetros: contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos, concentração protéica no soro, atividade da fenoloxidase (PO), atividade da α 2-macroglobulina (α 2-M) e atividade hemaglutinante do soro. Após o teste do estresse salino, foi observado que as PL's expostas aos PS na concentração de 100 mg L⁻¹ apresentaram uma tendência de maior sobrevivência, mas não houve diferença significativa entre os tratamentos. Com relação aos imunoparâmetros, a CTH foi reduzida quando os animais foram expostos aos PS e nas concentrações mais altas a CTH voltou aos valores normais. Porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle. No entanto, a diferença significativa foi observada entre os tratamentos que foram expostos ao PS. O número de hemócitos granulares (HG) apresentou uma tendência de queda na concentração de 60 mg L⁻¹ e, com o incremento da concentração de PS, os valores de HG também tenderam a aumentar, porém não houve diferenças significativas em relação ao controle. No entanto, foi observada diferença significativa entre as contagens de HG nas concentrações de 60 e 240 mg L⁻¹. A atividade da PO foi significativamente reduzida na concentração de 60 mg L⁻¹ o que pode estar relacionado ao baixo valor de CTH como também à elevada atividade do inibidor de protease α 2-M. A atividade da PO voltou a ser semelhante à obtida no controle com o aumento da concentração de PS para 120 mg L⁻¹ e foi novamente reduzida na maior concentração (240 mg L⁻¹). A atividade do inibidor de protease α 2-M foi significativamente elevada quando os animais foram expostos aos PS nas concentrações de 60 e 240 mg L⁻¹, enquanto essa atividade se manteve semelhante ao controle na concentração de 120 mg L⁻¹. Dessa forma, não houve necessidade de regulação do sistema proPO, quando os camarões foram expostos à concentração intermediária dos PS de *S. platensis*. A administração dos PS de *S. platensis* aos camarões *L. vannamei* foi capaz de modular a resposta imunológica desses animais de maneira diferente, dependendo da concentração utilizada. Com a realização deste experimento pode-se concluir que a concentração intermediária de 120 mg L⁻¹ foi a mais eficiente, já que manteve os níveis de hemócitos circulantes e as atividades basais da PO e α 2-M.

Palavras-chave: polissacarídeo sulfatado; *Spirulina platensis*; imunoparâmetros; *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

Aquaculture is the food-producing activity that presented the fastest growth worldwide and the cultivation of marine shrimps had the highest average growth rate over the past 50 years. The search for growing up the production, obtained through the increase on the density, carrying the animals on condition stress and the appearance of diseases. The use of immunostimulants on aquaculture, like the sulfated polysaccharides (SP), resulted in an enhancement of the animal's resistance against pathogenic microorganism and stress situations. The aim of this study was to evaluate the effect of the SP of *Spirulina platensis* in post-larvae (PL's) and juvenile of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* through immersion baths. The administration of the SP to *L. vannamei*'s PL's was performed at concentrations of 0 (control), 50, 100 and 200 mg L⁻¹, two hours before the evaluation of their resistance to the salt stress test. The juveniles of *L. vannamei* were exposed for three hours to the SP of *S. platensis* at concentrations of 0 (control), 60, 120 and 240 mg L⁻¹ followed by a hemolymph collection for analysis of the following immune parameters: haemocytes total (THC) and differential (DHC) counts, serum protein concentration, activity of phenoloxidase (PO), activity of α 2-macroglobulin (α 2-M) and serum hemagglutinating activity. After the salt stress test it was observed that the PL's that were exposed to the SP at a concentration of 100 mg L⁻¹ showed a tendency of a higher survival rate but there was not any significant difference between the treatments. Regarding the immune parameters, THC was reduced when the animals were exposed to the SP, while the exposure of shrimp to higher concentrations of PS resulted in normal values of the THC. However, no significant difference between treatments and control. But, the significant difference ($p \leq 0.05$) was observed between the treatments that were exposed to PS. The number of granular haemocytes (GH) showed a downward trend in the concentration of 60 mg L⁻¹ and, with increasing concentration of SP, the values of HG also tended to increase, but without significant differences compared to that of the control. However, significant differences were observed between the number of HG at concentrations of 60 and 240 mg L⁻¹. The PO activity was significantly reduced at a concentration of 60 mg L⁻¹ which may be related to the low value of THC as well as the high activity of the protease inhibitor α 2-M. The PO activity was again similar to that obtained in control with increasing concentration of SP to 120 mg L⁻¹ and was further reduced in the highest concentration (240 mg L⁻¹). The activity of the protease inhibitor α 2-M was significantly higher when the shrimps were exposed at concentrations of 60 e 240 mg L⁻¹, while this activity was similar to that of control at a concentration of 120 mg L⁻¹. Thus, there was no need for regulation of the proPO system, when the shrimp were exposed to an intermediate concentration of SP of *S. platensis*. The administration of SP of *S. platensis* to shrimps *L. vannamei* was able to modulate the immune response of these animals in different forms depending on the concentration used. So analyzing the results it is possible to conclude that the intermediate concentration of 120 mg L⁻¹ was the most efficient, since it maintained the levels of circulating hemocytes and the basal activities of PO and α 2-M.

Keywords: sulphated polysaccharide; *Spirulina platensis*; immuneparameters; *Litopenaeus vannamei*

LISTA DE TABELAS

1. Parâmetros da qualidade da água duas horas após a administração do PS de *S. platensis* na água de cultivo dos camarões 40

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados extraídos da biomassa seca de <i>Spirulina platensis</i> .	37
Figura 2	Mortalidade média (%) das PL's ₁₇ submetidas ao teste de estresse salino, após o banho de imersão com os PS de <i>S. platensis</i> .	38
Figura 3	Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões <i>L. vannamei</i> três horas após o banho de imersão de PS de <i>S. platensis</i> . As barras representam à média \pm DP das contagens obtidas de 4 <i>pools</i> de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) da CTH entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da CTH nas diferentes concentrações de PS na água.	43
Figura 4	Percentual de hemócitos granulares e hialinos em <i>L. vannamei</i> submetidos ao banho de imersão com PS de <i>S. platensis</i> após três horas da administração. As barras representam a media \pm DP do percentual de HG em 4 <i>pools</i> de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CDH nas diferentes concentrações de PS na água.	45
Figura 5	Atividade da fenoloxidase (PO) em <i>L. vannamei</i> três horas após a administração de PS de <i>S. platensis</i> . As barras representam \pm DP da atividade da PO em 4 <i>pools</i> de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da atividade da PO entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da atividade da PO nas diferentes concentrações de PS na água.	48
Figura 6	Atividade da $\alpha 2$ -Macroglobulina ($\alpha 2$ -M) em <i>L. vannamei</i> três horas após a administração de PS de <i>S. platensis</i> por banho de imersão. As barras representam à média \pm DP da atividade da $\alpha 2$ -M em 4 <i>pools</i> de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da $\alpha 2$ -M entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da $\alpha 2$ -M nas diferentes concentrações de PS na água.	49
Figura 7	Concentração protéica totais no soro (CP) em <i>L. vannamei</i> três horas após a administração de PS de <i>S. platensis</i> . As barras representam \pm DP da CP em 4 <i>pools</i> de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) da CP entre os tratamentos. Asteriscos representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da CP nas diferentes concentrações de PS na água.	52
Figura 8	Atividade hemaglutinante do soro dos camarões, contra eritrócitos de coelho em <i>L. vannamei</i> , três horas após a administração de PS de <i>S. platensis</i> via banho de imersão. As barras representam a média \pm DP da atividade aglutinante do soro (4 <i>pools</i> de 5 camarões) nas diferentes concentrações de PS na água.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α 2-M	Alfa2-Macroglobulina
β -glucano	Beta-glucano
AMP's	Proteína/peptídeos antimicrobianos
BAPNA	<i>Nα-Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride</i>
BIOMAR – LAB	Laboratório de Bioquímica Marinha
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CDH	Contagem diferencial de hemócitos
CEBIAQUA	Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura
CE	Estado do Ceará
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COMPESCAL	Comercio de Pescado Aracatiense LTDA
CP	Concentração protéica
CTH	Contagem total de hemócitos
DO _{680nm}	Densidade óptica em comprimento de onda de 680 nanômetros
DMB	Azul Dimetil Dimetilano
dsRNA	<i>double-stranded</i> RNA
EQA	Extração Quente Aquoso
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acético Dissódico
FAO	Food and Agriculture Organization of The United Nations
IMNV	Vírus da mionecrose infecciosa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCMV	Citomegalovirus humano
HG	Hemócitos granulares
HSG	Hemócitos semi-granulares
HH	Hemócitos hialinos
HSV	Herpes vírus simples
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeos
LTDA	Limitada
MAS	Anticoagulante Modificado de Alsever
MAS-formol	48mL de MAS + 2mL de formaldeído 37%
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células <i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
NT	Número de tricomas
O ₂	Gás oxigênio
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OD	Oxigênio dissolvido
ONOO ⁻	Peroxinitrio
p	Nível de probabilidade
PAMP's	Padrões moleculares de microrganismos
PB	Proteína bruta

PGs	Peptidoglicanas
pH	Potencial hidrogeniônico
PL's	Pós-larvas
PO	Fenoloxidase
proPO	Pró-fenoloxidase
PRP's	Proteínas de reconhecimento-padrão
R ²	Correlação linear
ROI's	Espécies reativas de oxigênio
RNI's	Espécies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
TBS/PO	Tampão Tris salino
“U”	Microplacas com fundo em U
UFC	Universidade Federal do Ceará
WWSV	Vírus da mancha branca

LISTA DE SÍMBOLOS

±	Desvio padrão
cm	Centímetros
°C	Graus Celsius
g	Gramas
g L ⁻¹	Gramas por litro
L	Litros
mg	Miligramas
mg g ⁻¹	Miligramas por grama
mg L ⁻¹	Miligramas por litro
mg mL ⁻¹	Miligramas por mililitro
min.	Minutos
mM	Milimolar
µm	Micrometros
M	Molar
d ⁻¹	Por dia
kg ⁻¹	Por kilograma
mL ⁻¹	Por mililitro
%	Porcentagem
PL's mL ⁻¹	Pós-larvas por mililitro
x g	Vezes a força G

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	A carcinicultura no Brasil	17
2.2	Spirulina	19
2.3	Considerações sobre o sistema imunológico dos crustáceos	21
3	OBJETIVOS	27
3.1	Objetivo geral	27
3.2	Objetivos específicos	27
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	Cultivo e produção da biomassa de <i>Spirulina platensis</i>	28
4.2	Extração de polissacarídeos sulfatados	28
4.3	Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados	29
4.4	Animais e desenho experimental	29
4.5	Coleta da hemolinfa e análise dos imunoparâmetros	31
4.5.1	Contagem total (CTH) e diferencial de hemócitos (CDH)	32
4.5.2	Concentração proteínas totais do soro (CP)	32
4.5.3	Atividade do inibidor de protease α 2-macroglobulina (α 2M)	32
4.5.4	Atividade da fenoxidase (PO)	33
4.5.5	Avaliação da atividade hemaglutinante da hemolinfa	33
4.6	Teste de estresse salino nas PL's	34
4.7	Análises estatísticas	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de <i>S. platensis</i>	36
5.2	Teste de estresse salino nas PL's após o banho de imersão	37
5.3	Administração do PS de <i>S. platensis</i> a juvenis de <i>L. vannamei</i>	40
5.4	Avaliação dos Imunoparâmetros em juvenis de <i>L. vannamei</i>	40
5.4.1	Contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos	42
5.4.2	Atividades da fenoxidase (PO) e do inibidor de protease α 2-macroglobulina (α -2M)	47
5.4.3	Concentração de proteínas totais (CP) no soro	52
5.4.4	Atividade hemaglutinante da hemolinfa	53
6	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura é uma importante atividade do setor agropecuário, principalmente no nordeste brasileiro, onde é responsável por 98% da produção do país e pela geração de 3,7 empregos ha⁻¹ (ROCHA, 2011). Segundo a FAO (2010), esta atividade vem crescendo em todo o mundo e a China continua sendo responsável pelas maiores produções.

O cultivo de camarões é uma atividade que atrai grandes investimentos, principalmente pelo alto valor de mercado do seu produto, cujo volume de exportação nos anos de 2003/4 foi bem superior a outros setores do agronegócio brasileiro. No entanto, o volume de exportação tem caído significativamente nos últimos anos, principalmente em consequência do surgimento de doenças que reduziram a produção, bem como pelas altas taxas impostas pelo mercado exterior ao camarão produzido no Brasil, resultando no redirecionamento da produção para o mercado interno.

A região nordeste do Brasil apresenta boas condições climáticas para a produção de camarões marinhos devido à grande disponibilidade de luz e água salgada, bem como altas temperaturas na maior parte do ano e, por essas razões, têm atraído grandes empreendimentos para o setor. No entanto, com o intuito de aumentar a produção os cultivos foram cada vez mais intensificados, levando os organismos a condições de estresse o que facilita o surgimento de doenças oportunistas, causadas por bactérias e vírus podendo resultar, no caso dos últimos, em grandes mortalidades (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O emprego de bactericidas na aquíicultura foi sempre realizado de maneira incorreta, sem a realização de um estudo prévio para determinar a espécie patogênica, a droga e qual sua concentração mais eficiente. O uso de antibióticos como medida profilática é realizado principalmente nos países em desenvolvimento onde não há regulamentação para o uso dessas drogas em ambientes aquáticos (CARNEIRO et al. 2007). O uso indiscriminado de bactericidas nos ambientes de produção animal proporciona, dentre os principais riscos, a seleção de cepas resistentes no ambiente, a alteração da microbiota natural e a transferência de bactérias potencialmente patogênicas aos seres humanos. Portanto, o emprego de antibióticos na aquíicultura no

tratamento de patologias bacterianas deve ser evitado, pois os mesmos mostram-se limitados devido as suas baixas eficácias e possível desenvolvimento de cepas resistentes, alterando a microbiota natural da água (COSTA *et al.*, 2008, HÖLMSTROM *et al.*, 2003).

Uma alternativa a essa pratica é a utilização de bactérias benéficas ou de substâncias que estimulem o sistema imunológico dos organismos aquáticos. Segundo Raa (2000), os compostos imunoestimulantes ativam as células de defesa dos organismos, promovendo maior resistência a infecções causadas por vírus, bactérias, fungos ou parasitas. Este aumento na resistência às doenças ocorre de uma maneira não específica, através da ativação do sistema imune inato dos organismos (SAKAI, 1999).

Os vertebrados possuem dois tipos de defesa imunológica, a específica ou adquirida e a inespecífica ou inata, enquanto nos invertebrados, até o presente momento, só é conhecido o tipo inato. Apesar do limitado alcance de proteção deste último, ele apresenta uma grande eficiência que tem garantido a existência dos invertebrados ao longo da evolução. O sistema de defesa inato, semelhante ao adquirido, também é baseado tanto em respostas celulares como na atividade de moléculas efetoras (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; ELLIS *et al.*, 2011).

O sistema imune inato é ativado logo após o reconhecimento da invasão de um organismo patogênico com o objetivo de matá-lo e evitar a infecção. Já o sistema imune adaptativo ou adquirido possui uma infinidade de receptores que desencadeiam a produção de anticorpos altamente específicos, permitindo o desenvolvimento de uma memória imunológica (FEARON, 1997; JANEWAY; MEDZHITOV, 2000).

Nos últimos anos, vários compostos com atividade imunoestimulante têm apresentado resultados satisfatórios na aquicultura, principalmente melhorando a sobrevivência dos organismos. Estes compostos são obtidos a partir da parede celular de diversas bactérias e fungos como os lipopolissacarídeos (LPS), β -glucanos e peptidoglicanas (PGs), isolados de micro ou macroalgas como os polissacarídeos sulfatados (PS), ou ainda extraídos da carapaça de crustáceos, como a quitina e seu derivado a quitosana (SONG; HUANG, 2000; GOPALAKANNAN; ARUL, 2006). Os imunoestimulantes podem ser administrados aos animais aquáticos através de injeção, por via oral (incorporado na ração) e ainda em banhos de imersão (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Muitos trabalhos com camarões marinhos relatam uma variação na produção de moléculas efetoras e/ou um aumento na produção de hemócitos circulantes ou ainda uma elevação da capacidade hemaglutinante da hemolinfa, quando os animais são expostos a β -glucanos, polissacarídeos sulfatados e a extratos de algas e plantas medicinais, caracterizando um efeito imunoestimulante (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002; HUANG; ZHOU; ZHANG, 2006; YEH; CHEN, 2009; HARIKRISHNAN *et al.*, 2011). Recentemente, alguns trabalhos têm avaliado os imunoparâmetros de camarões expostos a extratos obtidos da cianofícea *Spirulina* (TAYAG *et al.*, 2010, LIN *et al.*, 2010).

Contudo, a grande variação dos níveis basais dos imunoparâmetros em camarões cultivados dificulta a interpretação e o entendimento dos efeitos obtidos com o uso de imunoestimulantes. Devido ao potencial efeito imunomodulador de extratos obtidos da biomassa seca da cianofícea *Spirulina platensis*, é de extrema importância a realização de mais estudos para a caracterização dessas respostas em camarões marinhos cultivados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A carcinicultura no Brasil

A aquicultura é considerada um importante setor do agronegócio tanto do ponto de vista econômico, por movimentar um considerável montante de valores, como social através da geração de renda e emprego. Além disso, a produção de proteína animal é de grande necessidade para suprir a crescente demanda por alimento da população humana. No entanto, deve-se levar em consideração que essa atividade ainda é muito dependente da pesca extrativa, já que necessita de uma grande quantidade de farinha e óleo de peixe para o preparo de rações, o que pode ser um fator limitante já que os estoques pesqueiros naturais, em sua grande maioria, estão em estado de sobre-exploração ou bem próximos, impedindo o crescimento da produção pesqueira nos últimos anos (FAO, 2010).

Dentre os setores que produzem alimentos de origem animal a aquicultura, em todo o mundo, continua sendo o que apresenta a maior taxa de crescimento, chegando a ser até mesmo superior à taxa de crescimento da população humana. Esse crescimento resultou em um incremento no consumo de pescado que passou de 0,7 em 1970 para 7,8 kg de pescado por pessoa para o ano de 2008, representando uma taxa de crescimento anual média de 6,6% (FAO, 2010).

A produção da aquicultura é praticamente toda voltada para a alimentação humana e, em escala mundial, foi responsável por 45,7% da produção total mundial de pescado. A Ásia e outras regiões do Pacífico contribuíram com 89% da produção mundial já que, somente a China, o maior produtor mundial, foi responsável por 62% dessa produção (FAO, 2010).

A carcinicultura, ou o cultivo de crustáceos, apresentou uma taxa de crescimento anual média de aproximadamente 15% de 2000 a 2008, e de 17% nos últimos 50 anos, quando também se destacou em relação aos demais cultivos. Esse rápido desenvolvimento foi reflexo do aumento no cultivo do camarão branco do Pacífico *Litopenaeus vannamei* na China, Tailândia e Indonésia. A atividade contribuiu com

46,4% do total de camarões e representou 15% do valor total de pescados comercializados no mundo. Atualmente, esta espécie é a mais cultivada mundialmente e a China continua sendo o maior produtor (FAO, 2010).

O cultivo de camarões no Brasil teve início durante a década de 80 com a introdução do peneídeo *Marsupenaeus japonicus* no nordeste brasileiro. No entanto, devido às baixas salinidades empregadas no cultivo, a espécie não se adaptou bem às condições do nordeste (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002). Tentativas de domesticação das espécies nativas *Litopenaeus schmitti* (OSTRENSKY, 1997), *Farfantepenaeus paulensis* (WASIELESKY, 2000; KRUMMENAUER *et al.*, 2006) também foram realizadas. Porém, a baixa lucratividade obtida em todos os pacotes tecnológicos desenvolvidos para estas espécies resultou na desativação das fazendas.

No início dos anos 90, a introdução da espécie exótica *L. vannamei*, juntamente com sua tecnologia de produção, fez com que a carcinicultura brasileira passasse a se desenvolver rapidamente, principalmente na região nordeste que chegou a ser responsável por 95,2% da produção nacional (ROCHA; RODRIGUES; AMORIM, 2004).

Apesar dos aspectos positivos para a carcinicultura brasileira, principalmente na região nordeste, devido à grande disponibilidade de luz e água com temperatura e variações de salinidade muito bem toleradas pelos camarões, a intensificação da produção e o crescimento no número de fazendas vêm resultando em uma crescente degradação do meio ambiente por falta de tratamento de seus efluentes, bem como no surgimento de inúmeras doenças infecciosas, na sua maioria de origem viral, que limitam o desenvolvimento do setor e algumas vezes causam grandes impactos na produção (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). As altas densidades de estocagem, normalmente utilizadas nos cultivos, proporcionam a rápida disseminação dos agentes infecciosos resultando, geralmente, em massivas mortalidades que ocasionam grandes perdas econômicas (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

Atualmente, a carcinicultura mundial vem enfrentando sérios desafios, especialmente relacionados às enfermidades e à degradação ambiental. Estes fatores, juntos ou isolados, têm se agravado devido à intensificação dos cultivos que, na maioria das vezes, não levam em conta os aspectos ecológicos e fisiológicos dos animais (BACHÈRE, 2000). Sabe-se também que fatores ambientais potencialmente estressores,

como alterações nos parâmetros físico-químicos da água, presença de metais pesados, pesticidas agrícolas e outros poluentes ambientais, podem debilitar o sistema imunológico dos camarões e propiciar o surgimento de doenças (LE MOULLAC; HAFNER, 2000). Além disso, a água dos cultivos abriga naturalmente inúmeros microorganismos e parasitas e, uma vez instalada a doença, a transmissão entre os animais é rapidamente veiculada.

Dessa forma, as boas práticas de manejo como também as baixas densidades empregadas nos cultivos, a boa qualidade de água e o controle das condições de estresse são de grande importância para o sucesso da carcinicultura e prevenção de doenças oportunistas. Outra ferramenta é o uso de compostos imunoestimulantes que aumentam a resistências destes organismos a agentes patogênicos.

2.2 *Spirulina*

As microalgas apresentam grande importância para a aquicultura na manutenção da qualidade da água, assimilando nutrientes dissolvidos e carbono para a produção de matéria orgânica e oxigênio durante a fotossíntese (DERNER, 1996). Além disso, muitas espécies de peixes, crustáceos e moluscos são dependentes das microalgas como alimento para o sucesso nas larviculturas.

As microalgas também apresentam um grande potencial biotecnológico, principalmente devido à produção de muitas substâncias de interesse como polissacarídeos, pigmentos, ácidos graxos essenciais, entre outros. Além disso, a grande diversidade de espécies e, conseqüentemente, uma grande variabilidade de compostos naturais, aliados ao emprego de melhoramento genético e técnicas de cultivo em larga escala, vem aumentando o interesse na produção de determinadas espécies de microalgas (DERNER *et al.*, 2006).

O gênero *Spirulina*, também conhecido como *Arthrospira*, pertence à família Oscillatoriaceae e ao filo Cyanophyta e é constituído de, pelo menos, 38 espécies de cianobactérias microscópicas e filamentosas. São também conhecidas como alga azuis-esverdeadas e caracterizadas por uma cadeia de células envolvidas por uma fina bainha

de mucilagem. Estes organismos também apresentam um longo histórico de uso na alimentação humana e animal (BELAY, 2002; SHARMA *et al.*, 2005).

Existem relatos do uso de spirulina pela civilização Asteca no México como alimentação a mais de 400 anos e, até os dias atuais, a tribo Kanembu do lago Kossorom na República do Chade, na África, comercializa a biomassa seca dessa microalga para consumo humano na forma de uma torrada denominada *dihe* (ABDULQADER; BARSANTI; TREDICI, 2000).

A partir das últimas três décadas, a biomassa de spirulina produzida comercialmente tem tido, como principal destino, a alimentação humana e animal, bem como a extração de pigmentos (BELAY, 1997). A capacidade desta alga se desenvolver em pH elevado dificulta a contaminação por outras espécies, facilitando o seu cultivo em larga escala.

A spirulina é a principal alga produzida em ambientes aquáticos continentais e os principais produtores são a China e o Chile. Em outros países produtores, os cultivos são predominantemente realizados em tanques de cimento e a biomassa é direcionada para suplementação alimentar humana e ração animal (FAO, 2010).

O interesse na produção de spirulina é principalmente devido ao alto teor de proteína na biomassa que pode alcançar de 60 a 70% de seu peso seco, além da presença de vitaminas do complexo B₁₂, provitamina A, aminoácidos, ácidos graxos essenciais, como o γ – linolênico e vários minerais (BELAY, 2002).

Alguns trabalhos relatam a utilização da biomassa de spirulina ou seus extratos como imunostimulantes. Belay (2002) apresenta uma lista com diferentes estudos de suas propriedades imunostimulantes em diferentes organismos. A realização de vários estudos relatando as aplicações de compostos obtidos de spirulina a tornaram uma potencial fonte de substâncias nutraceuticas (ANDREWS *et al.*, 2011).

O extrato quente aquoso e os polissacarídeos obtidos de spirulina possuem propriedades antioxidantes que podem inibir a replicação viral, o desenvolvimento de câncer e ainda aumentar a produção de anticorpos (MIRANDA *et al.*, 1998, BELAY, 2002; HAYASHI *et al.*, 1998; HIRAHASHI *et al.*, 2002).

O uso de um extrato quente aquoso de *Spirulina platensis* por via oral ativou o sistema imune inato humano pelo aumento na produção de interferon e aumentou a citotoxicidade das células *natural killer* (NK) (HIRAHASHI *et al.*, 2002). Outro extrato quente aquoso, obtido da espécie *S. máxima*, inibiu a infecção de vários vírus, entre eles os vírus do herpes tipo I e II (HSV-1 e 2) e o citomegalovirus humano (HCMV) (HERNÁNDEZ-CORONA *et al.*, 2002).

Em organismos aquáticos cultivados, o uso de uma dieta enriquecida com a biomassa de *S. platensis* resultou em um aumento da atividade fagocítica e produção do anion superóxido por células fagocitárias isoladas dos rins da carpa comum, *Cyprinus carpio*, e do bagre do canal, *Ictalurus putactus* (WATANUKI *et al.*, 2006; DUNCAN *et al.*, 1996).

Outros relatos também mostram o efeito imunoestimulante da spirulina em camarões. Tayag *et al.*, (2010) verificaram uma maior resistência de *L. vannamei* contra o *Vibrio alginolyticus*, após a administração do extrato quente aquoso de spirulina via injeção ou banho de imersão, sendo que, no último caso, ocorreu um retorno mais rápido dos imunoparâmetros aos níveis basais, após o estresse dos camarões com pH baixo (LIN *et al.*, 2010). Quando o camarão *Penaeus mergueneis* foi alimentado com uma ração enriquecida com a biomassa de *S. platensis* foi observado um aumento na atividade fagocítica dos hemócitos (LEE *et al.*, 2003).

2.3 Considerações sobre o sistema imunológico dos crustáceos

O camarão *L. vannamei* como todos os crustáceos possuem apenas o sistema imune inato que se constitui na principal defesa imunológica contra o ataque de microrganismos invasores como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Este sistema é constituído de componentes celulares e humorais (moléculas efetoras) que atuam simultaneamente com o objetivo de eliminar ou neutralizar os microrganismos invasores (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

A carapaça quitinosa é considerada como o primeiro sistema de defesa dos camarões e funciona como uma barreira físico-química contra patógenos, enquanto o

trato digestivo, que é a principal via de entrada de patógenos, está em segundo plano e se caracteriza como um ambiente inóspito, devido ao seu pH ácido e a presença de enzimas capazes de inativar e digerir a maioria dos microrganismos que não faz parte da flora natural destes animais. Quando estas barreiras são ultrapassadas é desencadeada, no hospedeiro, uma série de reações imunológicas com o objetivo de neutralizar e eliminar os agentes invasores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O sistema de defesa inespecífico (inato) dos crustáceos envolve vários processos, moléculas efetoras e células, tais como a coagulação da hemolinfa, a melanização realizada pelo sistema Pro-fenoloxidase (proPO), o reconhecimento e aglutinação realizada por lectinas, proteínas e peptídeos com atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral, RNA de interferência e proteínas de reconhecimento padrão, produção de formas reativas de oxigênio e nitrogênio e os processos fagocíticos e de encapsulação (IWANAGA; LEE, 2005).

O sistema imune inato dos crustáceos está intimamente relacionado à hemolinfa, que consiste de uma fração celular, cujas células circulantes são os hemócitos e de uma fração líquida, constituída pelo plasma que contem os fatores humorais dissolvidos. A principal função da hemolinfa é a defesa contra os organismos patogênicos, mas também funciona para o transporte de substâncias e oxigênio. As respostas imunes humorais e celulares atuam de forma combinada, amplificando a proteção dos organismos contra a ação dos invasores (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008). Em crustáceos decapodos, os hemócitos circulantes são geralmente classificados em três tipos: os hialinos (HH) com ausência ou presença de poucos grânulos, os semi-granulares com grânulos pequenos no citoplasma (HSG) e os granulares (HG) com grânulos grandes (SÖDERHÄLL; SMITH, 1983; TSING *et al.*, 1989; JOHANSSON *et al.*, 2000).

Não existe um consenso geral sobre as funções que os diferentes tipos de hemócitos exercem na defesa dos crustáceos. Söderhäll; Smith (1983) afirmam que a principal função dos HH é a fagocitose, enquanto os HSG estão principalmente relacionados com a encapsulação, além de armazenar pequenas quantidades das moléculas que ativam o sistema pro-fenoloxidase (proPO). Já os HG seriam o principal sítio de armazenamento do sistema proPO, contudo sem uma evidente atividade fagocítica. Outros autores sugerem que os HH estão essencialmente relacionados ao

mecanismo de coagulação da hemolinfa, sendo atribuídas aos HSG e HG as funções de fagocitose de microrganismos, formação de cápsulas, nódulos, produção de moléculas tóxicas e antimicrobianas (HOSE; MARTIN; GERARD, 1990; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992; GARGIONI; BARRACCO, 1998). De modo geral, os HSG e HG são as células que armazenam as moléculas efetoras do sistema imune dos crustáceos e liberam substâncias citotóxicas por meio de sua degranulação que, por sua vez, é induzida pela presença de partículas estranhas ao hospedeiro, como os lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias (LPS) ou β -1,3 glucanos presentes em fungos (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Em relação às respostas imune-celulares, após a invasão do tecido dos crustáceos por microrganismos, os hemócitos migram para a região afetada gerando uma reação infecciosa. Quando estes microrganismos são de pequeno porte ocorre a fagocitose, formando um fagossoma que se une a um grânulo constituindo um fagolisossoma, que é responsável por liberar uma grande quantidade de moléculas citotóxicas e microbicidas, neutralizando os invasores (HOSE ; MARTIN; GERARD, 1990; MARTIN *et al.*, 1996; GARGIONI; BARRACCO, 1998; MUÑOZ *et al.*, 2002).

Na impossibilidade dos hemócitos realizarem a fagocitose, devido à quantidade maciça de microrganismos ou pelo grande tamanho das partículas e patógenos, essas células passam a formar nódulos e cápsulas, respectivamente. Os nódulos aprisionam uma grande quantidade de microrganismos invasores em agregados celulares, impedindo que esses possam acometer outras regiões do corpo do hospedeiro e resultar em septicemia. A formação de cápsulas ocorre através da formação de várias camadas de hemócitos que envolvem o patógeno com a função de aprisioná-lo e, posteriormente, destruí-lo. A formação de nódulos e cápsulas ocasiona respostas imunológicas localizadas que impedem os danos causados pelas moléculas tóxicas ao próprio hospedeiro, durante o processo infeccioso (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

É comum ocorrer a fagocitose dos microrganismos por parte dos hemócitos que se encontram nas regiões mais centrais dos nódulos como também a visualização de uma pigmentação escura (melanização) nos agregados de hemócitos, que também exercem uma função fungistática (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004) e sequestradora de radicais livres, minimizando os efeitos deletérios destas moléculas, altamente

tóxicas, tanto para os invasores quanto para o hospedeiro (NAPPI; VASS, 1993; NAPPI; OTTAVIANI, 2000).

O que desencadeia a ativação do sistema imune inato dos crustáceos é o reconhecimento do não próprio a partir do contato com o patógeno. As proteínas de reconhecimento-padrão PRP's (*pattern-recognition proteins*) são responsáveis por diferenciar o próprio do não-próprio, reconhecendo primariamente padrões moleculares específicos dos microrganismos denominados de PAMP's (*pathogen-associated molecular patterns*) que não são encontrados no hospedeiro (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; HOFFMANN *et al.*, 1999, JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

As PRP's são moléculas produzidas pelo hospedeiro e secretadas no plasma ou localizadas na superfície dos hemócitos que reconhecem os PAMP's e ligam-se a eles. Os principais PAMP's que são reconhecidos pelas PRP's em invertebrados são os lipopolissacarídeos (LPS) da superfície das bactérias gram-negativas, as peptidoglicanas (PGs) da parede celular das gram-positivas, as β -1,3-glicanas da parede de fungos e o dsRNA (*double-stranded RNA*) produzido durante a replicação de vários vírus (LEE; SÖDERHÄLL, 2002).

Qualquer que seja o tamanho dos PAMP's que penetrem no organismo dos crustáceos, eles serão reconhecidos e ligados às suas PRP's específicas, acionando assim o gatilho para a ativação do sistema imune inato do hospedeiro que é iniciado pela degranulação dos hemócitos, desencadeando uma resposta imune-celular com a produção e liberação de uma série de moléculas imunofetoras acompanhadas, ainda, pelo aumento da expressão de genes imunológicos específicos (BARRACCO, PERAZZOLO; ROSA, 2008).

A destruição e neutralização dos microrganismos invasores fagocitados pelos hemócitos se deve à produção e liberação de moléculas altamente tóxicas, como as espécies reativas de oxigênio ROI's (*reactive oxygen intermediates*) e nitrogênio RNI's (*reactive nitrogen intermediates*). No momento do contato e reconhecimento do patógeno a enzima NADPH-oxidase é ativada, ocorrendo um aumento significativo no consumo de oxigênio intracelular que resulta na produção de radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrio ($ONOO^-$) (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; MUÑOZ

et al., 2002; RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000; ANDERSON, 1996; MURPHY *et al.*, 1998).

Estes radicais livres também apresentam efeitos deletérios para o hospedeiro, já que os mesmos não distinguem o próprio do não-próprio. Como mecanismo de proteção, o hospedeiro produz várias enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutaciona-peroxidase e também conta com antioxidantes de origem exógena como as vitaminas C e E e a glutaciona (CAMPA-CÓRDOVA *et al.*, 2002; WARNER, 1994).

Os crustáceos possuem ainda proteínas e peptídeos antimicrobianos AMP's (*antimicrobial proteins/peptides*), que funcionam como antibióticos naturais, apresentando uma ação rápida e potente contra um amplo espectro de microrganismos, tais como bactérias, fungos filamentosos, leveduras e, em alguns casos, vírus e protozoários. As AMP's são consideradas de grande importância para o controle e prevenção de infecções nos crustáceos (BACHÈRE *et al.*, 2004; REDDY; YEDERY; ARANHA, 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O mecanismo de ação das AMP's é provocar a desestabilização da membrana celular dos microrganismos invasores e, conseqüentemente, sua morte. Estas proteínas e peptídeos geralmente apresentam uma ação detergente ou formadora de grandes poros, que levam ao desequilíbrio das funções da membrana, ou podem ainda entrar nas células, interferindo nas diferentes vias metabólicas essenciais ao ciclo de vida dos microrganismos (BULET; STÖCKLIN; MENIN, 2004; TOKE, 2005). Como as AMP's agem diretamente sobre a membrana das células, estrutura necessária para a sobrevivência dos microrganismos, os mecanismos de resistência para essas moléculas são praticamente inviáveis (BARRACCO; PERAZZOLO, ROSA, 2008).

Outra resposta imunológica dos crustáceos que se mostra bastante eficiente contra a invasão de microrganismos é o sistema proPO. Este eficiente sistema de defesa consiste de uma variedade de proteínas que são produzidas em uma cascata proteolítica e são responsáveis por reações citotóxicas que ativam a fagocitose e resultam na formação de nódulos e cápsulas, apresentando como resultado final a melanização (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). O sistema proPO é ativado por pequenas partículas de patógenos, ou seus PAMP's (LPS, β -1,3 glucanas) que invadem o organismo do hospedeiro. A melanização, resultado final do processo de defesa,

também tem a função de cicatrizar os ferimentos sofridos pelos crustáceos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

O sistema proPO é composto por varias PRP's, muitas serino-proteases e seus zimógenos, além da pro-fenoloxidase como também dos inibidores de protease, cuja principal função é minimizar os efeitos indesejados do sistema proPO que também apresenta danos ao hospedeiro (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004; LEE; SÖDERHÄLL, 2002). Acredita-se que os principais sítios de armazenamento das moléculas relacionadas ao sistema proPO sejam os hemócitos granulares e semi-granulares (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008; CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

Durante a cascata proteolítica, que resulta na produção da melanina, vários compostos intermediários como os ROI's, RNI's e as quinonas são produzidos e liberados para a hemolinfa. A melanina parece não ser uma molécula imunofetora, no entanto muitas funções já foram descritas para a mesma, tais como ação fungistática, sequestradora de radicais livres e cicatrização da cutícula (NAPPI; VASS, 1993; NAPPI; OTTAVIANI, 2000). Os compostos intermediários que são produzidos durante esse processo são as substancias citotóxicas mais eficientes dos crustáceos (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

Os inibidores de proteases dos invertebrados que regulam a ativação do sistema proPO estão presentes tanto no plasma como nos hemócitos. Dentre os já descritos temos a pacifastina (LIANG; SOTTRUP-JENSEN; SÖDERHÄLL, 1997), os inibidores da família Kazal (SOMPRASONG; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2006) e Kunitz, as serpinas α 2-Macroglobulina (α 2-M) (HERGENHAHN; HALL; SÖDERHÄLL, 1998; KANOST, 1999) e os inibidores de metalo-proteases (WEDDE *et al.*, 1998).

Para os crustáceos o principal inibidor de protease é a glicoproteína plasmática α 2-M que é constitutivamente sintetizada pelos hemócitos destes animais (GROSS *et al.*, 2001; RATTANACHAI *et al.*, 2004). Este inibidor apresenta um grande espectro de atuação e, além de regular a ativação excessiva dos sistemas proteolíticos, atua ainda inibindo as proteases exógenas produzidas durante o processo infeccioso, se caracterizando como uma molécula imunofetora (ARMSTRONG, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da administração dos polissacarídeos sulfatados da cianobactéria *Spirulina platensis* em juvenis e pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*, por meio de banhos de imersão.

3.2 Objetivos específicos

1. Extrair os polissacarídeos sulfatados (PS) da biomassa de *S. platensis*, determinar seu rendimento e fracioná-los em coluna de troca iônica;
2. Administrar os PS de *S. platensis* a juvenis de camarão e avaliar seus imunoparâmetros;
3. Administrar os PS de *S. platensis* em pós-larvas de *L. vannamei* e avaliar sua resistência após o teste de estresse salino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e produção da biomassa de *Spirulina platensis*

A cepa de *S. platensis* foi obtida de um cultivo integrado com a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) realizado no Município de Boa Viagem/CE. A cianobactéria foi concentrada em uma malha de 60 µm e transportada para a Estação de Piscicultura Prof. Raimundo Saraiva da Costa do Departamento de Engenharia de Pesca, onde foi inoculada em um tanque (10 x 5 m) previamente preparado com água salgada (salinidade 10) artificialmente, utilizando sal grosso comercial e bicarbonato de sódio (5 g L⁻¹). Após a fase de indução do crescimento, o volume da cultura foi elevado para cerca de 40 x 10³ L e o tanque foi povoado com 5.000 pós-larvas de Tilápia do Nilo dentro de um tanque-rede (5 x 3 m) com malha de 1 mm. A cianobactéria foi cultivada durante todo o período de reversão sexual dos peixes que teve uma duração de 28 dias. Durante este período, a concentração de *S. platensis* na água foi monitorada por espectrofotometria (DO_{680nm}) e mantida constante, através da filtragem da biomassa em uma malha de 60 µm que, depois de lavada, foi seca em estufa com recirculação de ar a 60 °C.

4.2 Extração de polissacarídeos sulfatados

A extração dos polissacarídeos sulfatados (PS) de *S. platensis* foi realizada a partir de um extrato quente obtido de acordo com a metodologia descrita por Tayag *et al.* (2010). Inicialmente 5 g de *S. platensis* em pó foram hidratadas em 300 mL de água destilada e a mistura foi fervida durante três horas. Após este período, o volume restante foi centrifugado a 7.280 x g por 20 min e filtrado, sendo o resíduo utilizado para uma nova extração. Para a obtenção dos PS, foram adicionados 4 volumes de álcool etílico absoluto gelado (-20°C) ao extrato e a nova mistura foi deixada em repouso a 4 °C por 24 h para a precipitação dos PS. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação a

7.280 x g por 5 min e o precipitado obtido foi seco em estufa com recirculação de ar a 60 °C por 24 h.

4.3 Fracionamento dos polissacarídeos sulfatados

Uma alíquota de 3 mL de uma solução de PS brutos (1 mg mL^{-1}) foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 + EDTA e cisteína 5 mM e o fluxo foi mantido em 60 mL h^{-1} . Em seguida, a alíquota foi aplicada no topo do gel e a eluição da coluna foi realizada passo a passo, com o tampão de equilíbrio contendo concentrações crescentes de cloreto de sódio (0,5; 0,7; 0,9; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 e 2,0 M), sendo coletadas frações de 1 mL. A presença dos PS nas frações foi verificada adicionando 200 μL das mesmas a 1 mL do corante azul dimetil dimetileno (DMB) e posterior leitura da absorbância por espectrofotometria com um comprimento de onda de 525 nm.

A presença de açúcar nas amostras foi detectada de acordo com o ensaio colorimétrico proposto por Dubois et al. (1956). O teste foi realizado em duplicata utilizando alíquotas de 50 μL das frações coletadas, as quais foram incubadas por 30 minutos com 350 μL de água destilada, 20 μL de fenol redestilado e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após incubação, a dosagem de carboidratos totais foi determinada com um espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

4.4 Animais e desenho experimental

Para a realização deste experimento foram utilizados 300 camarões juvenis da espécie *L. vannamei* com peso médio de $11,09 \pm 1,38 \text{ g}$ adquiridos da Fazenda Aquisia Aquicultura Saraiva LTDA, localizada no município de Paraipaba-CE, a 80 km de Fortaleza.

Os juvenis foram transportados ao laboratório em um *trans fish* com capacidade de 1.000 L, com suprimento de oxigênio puro. A duração do transporte foi de aproximadamente duas horas e, na chegada ao laboratório, os indivíduos foram aclimatados à temperatura ambiente e transferidos para um tanque de 2.000 L com aeração constante e água com salinidade 5. Durante dois dias, os camarões foram aclimatados para a salinidade 15, com um incremento diário de 5 e permaneceram nessas condições, durante uma semana, para a aclimação ao novo ambiente. Durante esse período, os indivíduos foram alimentados, duas vezes ao dia e até a saciedade, com ração comercial contendo 35% de proteína bruta (PB). Para manter a qualidade da água, foram realizadas trocas diárias que variaram de 30 a 75 % na intenção de manter os níveis de amônia total abaixo de 1 mg L^{-1} .

Passado o período de aclimação, os camarões foram transferidos para monoblocos com 10 L de água do mar com salinidade 15 na densidade de 1 camarão L^{-1} , em uma sala com temperatura de $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Após a estocagem, os PS de *S. platensis* foram administrados, diretamente na água, em quatro repetições, nas concentrações de 60, 120 e 240 mg PS L^{-1} , tendo ainda um grupo controle sem a adição de PS. Os animais ficaram no banho de imersão por um período de três horas e, após duas horas, foram coletadas amostras da água de cada repetição para a verificação dos parâmetros temperatura ($^\circ\text{C}$) e oxigênio dissolvido (mg L^{-1}), utilizando uma sonda da Hanna Instruments, e amônia total (mg L^{-1}) por espectrofotometria.

Para determinar a concentração da amônia total, a uma alíquota de 25 mL da água de cada cultivo foram adicionadas 3 gotas de álcool polivinil e a mistura foi homogeneizada. Em seguida, foram adicionadas 10 gotas de estabilizante mineral, homogeneizada novamente e, por último, 1 mL do reagente de Nessler foi pipetado na mistura. Após um minuto para o tempo de reação, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro HACH 2000 no comprimento de onda de 425 nm. Quando houve necessidade para a separação do material em suspensão, foi realizada uma centrifugação a $7.280 \times g$ por 5 minutos. Decorridas as três horas de exposição aos PS, foi realizada a coleta da hemolinfa de todos os camarões.

4.5 Coleta da hemolinfa e análise dos imunoparâmetros

A coleta da hemolinfa dos camarões foi realizada na própria sala do experimento ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e as análises dos imunoparâmetros no laboratório de Bioquímica Marinha (BIOMAR – LAB), ambos localizados nas dependências do CEBIAQUA.

A coleta da hemolinfa foi realizada conforme a metodologia descrita por Cantelli (2009) e foi obtida da região ventral de cinco animais por monobloco, na altura do primeiro segmento abdominal, previamente higienizado com álcool etílico, utilizando uma seringa de 1 mL com agulha (13 x 0,45; 27,5 G1/2”) resfriada a 4°C . Uma parte do volume retirado foi imediatamente transferido para um tubo eppendorf, adicionadas duas partes do anticoagulante modificado de Alsever, MAS (27 mM de citrato de sódio; 336 mM de NaCl; 115 mM de glicose e 9 mM de EDTA pH 7,2) e homogeneizado. Para evitar a coagulação da hemolinfa dentro da seringa, a última já continha um volume de 10 μL de MAS, Para a contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos (hemogramas), 50 μL da hemolinfa coletada em MAS foi diluída 9 vezes com MAS-formol (48 mL de MAS + 2 mL de formaldeído 37%).

Para avaliar a capacidade aglutinante, a atividade da $\alpha 2$ -macroglobulina, a atividade da PO e a concentração protéica foi utilizado o soro dos cinco animais restantes de cada monobloco. Para isso, a hemolinfa foi coletada e transferida para um tubo de centrifuga, no qual a mesma permaneceu até a coagulação total, aproximadamente duas horas após a coleta, em temperatura ambiente. A obtenção do soro foi realizada a partir de repetidas macerações do coágulo seguidas de centrifugações a $7.280 \times g$ por 5 min.

A hemolinfa total (hemolinfa + anticoagulante) e o soro foram aliquotados e armazenados a 4°C até a realização das análises. A hemolinfa coletada em MAS também foi utilizada para a atividade da $\alpha 2$ -macroglobulina, atividade da PO e concentração protéica.

4.5.1 Contagem total (CTH) e diferencial de hemócitos (CDH)

Para a contagem total de hemócitos (CTH), 10 μL da hemolinfa diluída em MAS-formol foram adicionados em cada lado de uma câmara de Neubauer (hematocitoômetro), onde foram contados os hemócitos, em duplicata, para cada repetição com um aumento de 400 vezes. A contagem diferencial dos hemócitos foi realizada a partir das mesmas amostras de CTH em microscopia de contraste de fase, com um aumento de 1000 vezes. A porcentagem relativa de hemócitos circulantes foi estimada contando-se, aleatoriamente, 100 células por *pool* de 5 camarões.

4.5.2 Concentração de proteínas totais do soro (CP)

A concentração de proteínas totais do soro foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando como proteína padrão a albumina sérica bovina (BSA). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.5.3 Atividade do inibidor de protease $\alpha 2$ -macroglobulina ($\alpha 2\text{M}$)

A atividade da $\alpha 2\text{M}$ foi avaliada através do ensaio de proteção da protease tripsina adaptado por Amstrong et al., 1996. Para isso, alíquotas de 50 μL de soro de cada repetição foram depositadas dentro de poços com fundo chato de uma microplaca e incubadas com 50 μL de uma solução de tripsina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) em tampão Tris 50 mM + NaCl 150 mM, pH 7,4 por 15 minutos a temperatura ambiente (27°C). Em seguida, foram adicionados 50 μL de inibidor de tripsina (1 mg mL^{-1}) diluída no mesmo tampão e a mistura foi novamente incubada por 10 minutos a 27°C . Por fim, 50 μL de uma solução de peptídeo cromogênico BApNA (*N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride*) foram adicionados à mistura e a liberação do peptídeo cromogênico foi

monitorada por espectrofotometria a 405 nm nos tempos de 0, 10, 20, 30 e 40 minutos a 27 °C. A atividade da α -2M, avaliada indiretamente através da atividade de tripsina imobilizada, foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligrama de proteína, em que, uma unidade de atividade enzimática correspondeu a um aumento de 0,001 na absorbância, por minuto e por miligrama de proteína. No controle negativo, o soro dos camarões foi incubado apenas com o tampão. Todos os testes foram realizados em triplicatas, com exceção da concentração de 120 mg de PS L⁻¹ devido a limitação do soro para este tratamento sendo realizado apenas um teste.

4.5.4 Atividade da fenoloxidase (PO)

A atividade da PO nas amostras de soro foi determinada pelo teste colorimétrico, por meio da formação do pigmento vermelho-coral DOPA-cromo. Para tal, 100 μ L de tampão salino TBS-PO (330 mM de NaCl + 5 mM de CaCl₂ + 10 mM de MgCl₂ e 50 mM de Tris, pH 7,6) foram adicionados, em triplicata, nos poços do controle e 50 μ L nos poços para determinação da PO basal. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço (controle, PO basal e PO induzida), 50 μ L de soro diluído 15 vezes em TBS-PO. Para a determinação da PO induzida, foram adicionados 50 μ L de tripsina (1 mg L⁻¹) em triplicata e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L do substrato enzimático L-DOPA (3 mg L⁻¹) foram adicionados nas misturas (PO basal e PO induzida) e a reação foi quantificada em leitora de microplacas a 490 nm, após 5, 10 e 20 minutos de incubação a temperatura ambiente.

4.5.5 Avaliação da atividade hemaglutinante da hemolinfa

As aglutininas presentes (lectinas) no soro obtido da hemolinfa dos camarões foram tituladas através de diluição seriada de 50 μ L de soro em 50 μ L de TBS-lectina (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) em duplicata dentro

de poços com fundo em “U” de uma microplaca e incubadas com 50 μL de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% em TBS, por 2 horas a temperatura ambiente. No controle, o soro do camarão foi substituído por TBS. O título aglutinante do soro foi expresso como o recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação, observada pela formação da roseta no fundo dos poços.

Lembrando que os animais que foram utilizados neste trabalho para a extração de sangue, foram mantidos em um biotério, com alimento e água de qualidade. Respeitando as normas do Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA).

3.6 Teste de estresse salino nas PL's

Para realização deste experimento foram utilizadas 2.000 pós-larvas no estágio XV (PL's₁₅), que foram cedidas pela empresa COMPESCAL, localizada no município de Aracati-CE, a 160 km de Fortaleza.

O transporte das PL's foi realizado em sacos plásticos contendo 2/3 do volume total de oxigênio puro e 1/3 com água da própria larvicultura com salinidade 35. Na chegada ao laboratório, as PL's foram aclimatadas à temperatura ambiente e estocadas em um monobloco de 70 L com aeração constante contendo água do mar com salinidade 35, permanecendo por dois dias para a aclimação as novas condições.

Após a aclimação às condições ambientais (Temperatura e pH), as PL's₁₇ foram submetidas a banhos de imersão com os PS de *S. platensis* por um período de duas horas nas concentrações de 50, 100 e 200 mg de PS L⁻¹, na densidade de 2 PL's mL⁻¹ em recipientes plásticos contendo 10 mL de água na salinidade 35, sendo também realizado um controle sem a adição de PS na água. Em seguida, as PL's₁₇ foram submetidas ao um teste de estresse salino pela transferência imediata para outros recipientes contendo água destilada na densidade de 0,2 PL mL⁻¹, permanecendo por 30 minutos. Após o estresse, as PL's foram imediatamente transferidas para os copos com água na salinidade 35 e, após uma hora, o resultado do estresse salino foi avaliado pela contagem de indivíduos mortos.

4.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos referentes aos ensaios realizados em todo o experimento foram submetidos, inicialmente, a uma análise de variância com fator único (ANOVA One-Way) e, no caso de diferenças significativas ao nível de 1 ou 5%, utilizou-se o teste de Tukey para comparação das médias. Os valores de porcentagens de CDH e mortalidade das PL'S₁₇ foram transformados para arco seno, e os da atividade aglutinante do soro para log₂, por não apresentarem homogeneidade de variância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Extração e fracionamento dos polissacarídeos sulfatados de *S. platensis*

Foram utilizados um total de 230 g da biomassa seca de *S. platensis* para a extração de 19,85 g de PS, correspondendo a um rendimento de aproximadamente 8,6%.

A dosagem total de açúcar (Dubois) no extrato bruto foi de 86%, mostrando que a extração a quente seguida de precipitação alcoólica foi bastante eficiente na remoção dos polissacarídeos de *S. platensis*. Segundo Tayag *et al.* (2010), o percentual de açúcar obtidos de *S. platensis* pelo método do extrato quente aquoso, sem a precipitação alcoólica, foi de 15,8%, valor bem inferior ao encontrado neste trabalho. Dessa forma, a modificação da metodologia de extração utilizada pelo referido autor, a adição de etanol absoluto gelado ao extrato aquoso para a precipitação dos PS, resultou em um aumento bastante significativo no teor de açúcar total do extrato bruto. Hayashi *et al.* (1996) e Aubrey, (2006) mostraram que o extrato quente aquoso de *S. platensis* possui polissacarídeos compostos, principalmente, por ramnose, frutose, galactose e glicose, semelhante ao obtido por Tayag *et al.* (2010) que relatam um polímero rico em ramnose e frutose, utilizando a mesma metodologia de extração.

Na cromatografia em DEAE-celulose dos PS extraídos de *S. platensis* foram obtidas duas frações principais com elevada metacromasia, sendo a maior eluída com 0,5 M e a menor eluída com 1,2 M de NaCl. Por outro lado, o teste de Dubois revelou uma elevada presença de açúcar apenas na maior fração (0,5 M), enquanto a menor fração (1,2 M) apresentou um baixo teor glicídico (Figura 1). Este perfil mostra uma menor relação metacromasia/açúcar total na segunda fração, o que sugere a presença de polissacarídeos com mais grupamentos sulfato por unidade de açúcar. Já essa relação na primeira fração foi bem semelhante, sugerindo um polímero com unidades de açúcar pouco sulfatadas e/ou algumas unidades sem sulfatação o que resulta em uma carga total negativa menor.

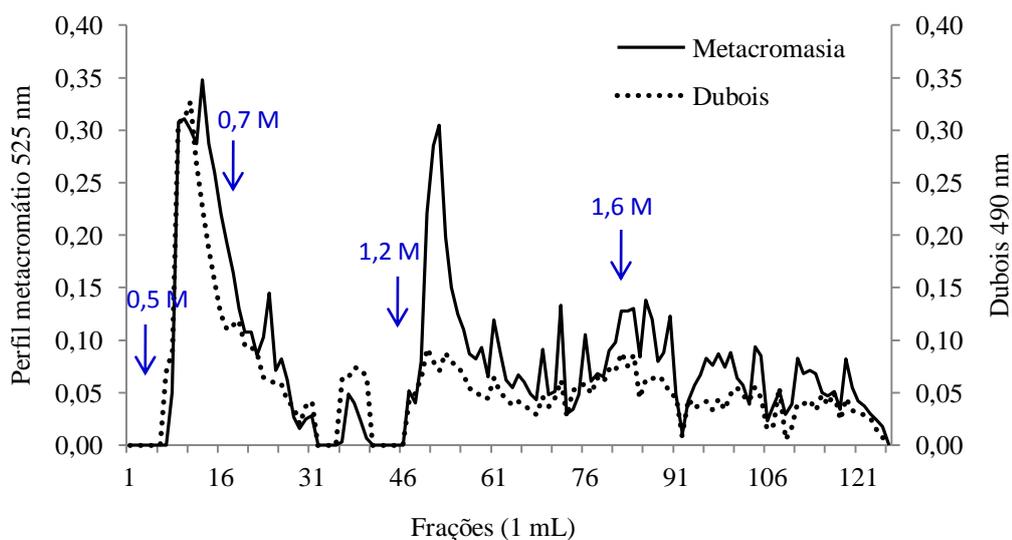


Figura 1: Cromatografia em DEAE-celulose dos polissacarídeos sulfatados extraídos da biomassa seca de *Spirulina platensis*.

5.2 Teste de estresse salino com PL's de *L. vannamei*

Quando as PL's₁₇ do camarão *L. vannamei* foram submetidas ao teste de estresse salino, após o banho de imersão com os PS extraídos de *S. platensis*, foi observada uma tendência de redução da mortalidade nas concentrações de 50 e 100 mg L⁻¹ com relação ao grupo controle que apresentou a maior mortalidade. No entanto, na maior concentração de PS utilizada (200 mg L⁻¹) a tendência foi de um novo aumento (Figura 2). Apesar das médias não apresentarem diferença estatisticamente significativa, a menor mortalidade absoluta foi obtida na concentração de 100 mg L⁻¹.

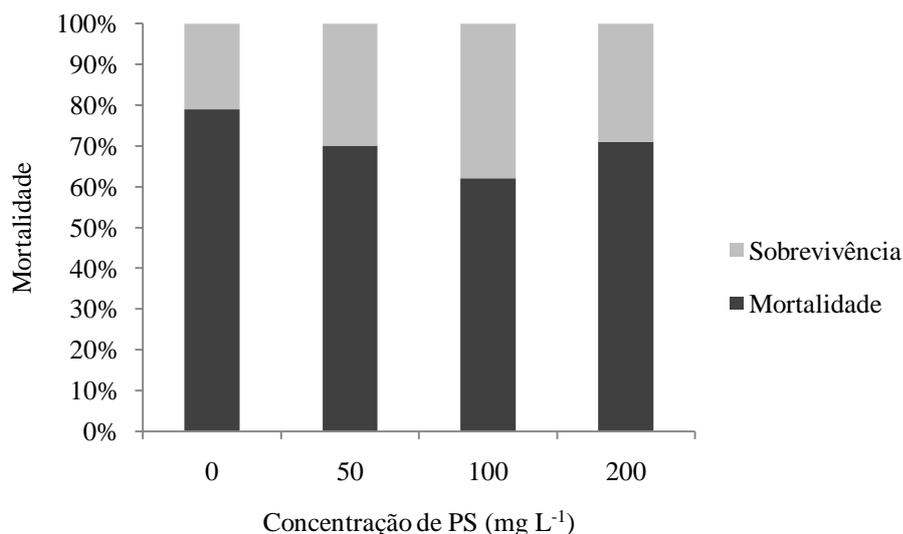


Figura 2: Mortalidade média (%) das PL's₁₇ submetidas ao teste de estresse salino, após o banho de imersão com os PS de *S. platensis*.

O teste de estresse salino, utilizado nas larviculturas de camarão marinho no momento da comercialização, é uma forma de avaliar a qualidade das PL's pelo aumento da resistência das mesmas a uma variação brusca de salinidade (BARBIERI; OSTRENSKY, 2001).

Rodrigues *et al.* (2008) realizaram um teste de estresse em PL's do camarão *L. vannamei*, utilizando como fator de estresse a baixa qualidade de água, após a administração por banho de imersão dos PS extraídos da macroalga marinha vermelha *Solieria filiformis*, e também não encontraram diferenças significativas entre as sobrevivências dos indivíduos nas diferentes concentrações utilizadas. No entanto, os autores afirmaram que no tratamento com 0,1 mg L⁻¹ de PS, os indivíduos apresentaram maior atividade natatória e um maior consumo de alimento, mesmo em condições de estresse.

Barroso *et al.* (2007) relataram que o banho de imersão em PL's de *L. vannamei* com os PS obtidos da macroalga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis*, em diferentes concentrações, resultou em uma menor mortalidade dos indivíduos na concentração intermediária. Lima (2007) observou um aumento na resistência de PL's de *L. vannamei* ao teste de estresse salino, quando submetidas a banhos de imersão com os PS extraídos da macroalga marinha parda *Spatoglossum schroederi* nas concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹. A autora também avaliou o efeito prolongado dos PS

de *S. schroederi* nas mesmas PL's, uma semana após a administração e encontrou sobrevivências de 87,5 e 77,25% para as concentrações de 2,0 e 4,0 mg L⁻¹ de PS na água, respectivamente.

O uso de PS por meio de banhos de imersão pode aumentar a resistência das PL's em diferentes condições de estresse. No entanto, esse fato parece está relacionado a uma determinada concentração de cada composto na água, indicando na maioria das vezes, uma ausência de uma relação dose/resposta. Neste trabalho, a mortalidade das PL's tendeu a diminuir quando foram expostas a concentração intermediária de PS (100 mg L⁻¹) de *S. platensis* e a tendência se inverteu na maior dose utilizada. De acordo com Sakai (1999), parece existir uma dose ótima desses compostos para a obtenção de um efeito satisfatório e, geralmente, o uso de doses elevadas pode ser até prejudicial aos indivíduos.

Recentes trabalhos mostram que o uso de PS extraídos tanto de micro como de macroalgas, aumentou a resistência de juvenis de camarões contra patógenos. Yeh; Chen (2009) observaram um significativo aumento na sobrevivência de juvenis de *L. vannamei* submetidos a um banho de imersão com o PS (600 mg L⁻¹) de *Gracilaria tenuistipitata* e, posteriormente, desafiados com o *Vibrio alginolyticus*. Tayag *et al.* (2010) também observaram um aumento na sobrevivência de juvenis da mesma espécie quando expostos aos PS de *S. platensis* seguido do desafio com *Vibrio alginolyticus*, independentemente da forma de administração ter sido via banho de imersão (400 mg L⁻¹) ou injeção (20 µg g⁻¹).

Sabry Neto (2007) utilizaram elevadas doses de vitamina C e β-1,3/1,6-glucano (600 mg kg⁻¹) incorporadas na ração para camarões *L. vannamei*, seguidas de indução da infecção com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). O autor não observou nenhuma melhora na sobrevivência dos animais que ficou semelhante a dos camarões infectados sem a adição de Vitamina C ou β-1,3/1,6-glucano. Por outro lado, quando foi utilizado apenas o β-1,3/1,6-glucano houve um aumento significativo na sobrevivência dos animais.

5.3 Administração do PS de *S. platensis* a juvenis de *L. vannamei*

A administração dos PS de *S. platensis* na água de cultivo dos camarões resultou na presença de uma espuma bastante intensa, principalmente nos tratamentos com as maiores concentrações do composto. No entanto, esse fato não afetou os animais e não foi verificada nenhuma mortalidade durante todo o experimento. Além disso, os parâmetros da qualidade de água (OD, T °C e amônia total), avaliados duas horas após o início da administração dos PS, ficaram dentro dos níveis desejados (Tabela 1) para o cultivo de camarões marinhos (BARBIERI; OSTRENSKY, 2002) e não interferiram nos resultados obtidos.

Tabela 1: Parâmetros da qualidade da água, duas horas após a administração do PS de *S. platensis* na água de cultivo dos camarões.

Tratamentos (mg/L)	OD (mg/L)	T (°C)	Amônia (mg/L)
0,0	6,0 ± 0,6	23,7 ± 1,7	0,8 ± 0,2
60,0	5,7 ± 0,4	24,1 ± 0,5	0,5 ± 0,1
120,0	6,1 ± 1,0	25,1 ± 1,4	1,0 ± 0,1
240,0	5,5 ± 0,4	23,7 ± 0,6	0,7 ± 0,1

5.4 Avaliação dos imunoparâmetros em juvenis de *L. vannamei*

A avaliação dos imunoparâmetros de *L. vannamei* é de grande importância por ser a espécie de camarão mais cultivada no mundo. O uso de imunoestimulantes é uma boa ferramenta para compreender o funcionamento do sistema imunológico destes animais. A correta utilização da relação dose/resposta melhora o desempenho zootécnico, bem como a resistência a patógenos como vírus, fungos e bactérias. Além disso, a existência de uma grande variedade de compostos imunomoduladores, obtidos

das mais variadas fontes, e a disparidade dos resultados devida à grande variação dos valores basais dos imunoparâmetros (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008), reforçam a necessidade de uma constante investigação da ação desses compostos nos diferentes estágios de vida dos camarões marinhos.

A spirulina (*Arthrospira*) é uma cianobactéria microscópica e filamentosa com um longo histórico de utilização na alimentação humana e animal (BELAY, 2002). O uso de *S. platensis* como suplemento alimentar reduziu a carga bacteriana de *Aeromonas hydrophila* no fígado e no rim da carpa comum *C. carpio*, além de aumentar a capacidade fagocítica e a produção de ânions superóxidos (WATANUKI *et al.*, 2006). No bagre do canal *Ictalurus punctatus*, o uso desta cianobactéria na ração promoveu um aumento na resistência contra a bactéria *Edwardsiella ictaluri* (DUNCAN; KLESZIUS, 1996). No camarão marinho *L. vannamei*, o uso de spirulina na ração promoveu um retardo no aparecimento dos sinais clínicos do vírus da mancha branca WSSV (RAHMAN *et al.*, 2006) e um aumento da resistência de camarões marinhos *Fenneropenaeus merguensis* à infecções causadas pelo *Vibrio harvery* (LEE *et al.*, 2003). Recentemente, o uso de um extrato de *S. platensis* via banho de imersão e injeção em camarões *L. vannamei* apresentou uma atividade imunoestimulante, resultando em um aumento na resistência contra o *V. alginolitycus* (TAYAG *et al.*, 2010).

A utilização de parâmetros hematológicos e bioquímicos para a avaliação do estado de saúde de organismos são ferramentas comumente empregadas dentro da medicina humana e veterinária. Na carcinicultura, as ferramentas indicadoras de saúde são os parâmetros hemato-imunológicos, dentre eles os mais empregados são: hemograma; tempo de coagulação da hemolinfa; atividade da enzima PO; índice fagocítico; produção de ROI's; título hemaglutinante e concentração de proteínas totais do plasma. No entanto, existe uma dificuldade de se estabelecer valores de referência desses parâmetros devido à grande variação dos valores basais nestes animais, mesmo se tratando de uma mesma população, sexo e estágio de desenvolvimento (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

5.4.1 Contagem total (CTH) e diferencial (CDH) de hemócitos

Foi verificada uma redução na contagem total de hemócitos circulantes (CTH), após o banho de imersão dos camarões na concentração mais baixa (60 mg L^{-1}) dos PS de *S. platensis*, comparada com o grupo controle (sem PS). No entanto, não foi verificada diferença significativa entre os tratamentos. Quando houve um incremento do PS na água os valores da CTH também aumentaram, e que o valor mais alto da CTH foi observado no tratamento de 240 mg L^{-1} . Houve diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) entre os tratamentos que foram adicionados o PS, já entre os tratamentos de 120 e 240 mg L^{-1} também houve diferença significativa ao nível de 5%. Porém, não foi observado diferença destes tratamentos quando comparados com o controle (Figura 3). É importante notar que, no controle, foi observada uma maior variabilidade nas contagens de CTH, enquanto nas concentrações de 120 e 240 mg L^{-1} o desvio padrão foi muito menor, indicando um maior número de camarões com CTH mais perto da média, principalmente na maior dose. A redução da CTH na menor concentração (60 mg L^{-1}) pode ser um resultado da migração de hemócitos para as áreas de contato com os PS. Por outro lado, nas concentrações mais elevadas de PS, essa migração pode ter sido compensada por um maior estímulo na produção de novos hemócitos pelo tecido hematopoiético dos animais. Assim, a exposição dos camarões aos PS de *S. platensis* parece ter simulado uma infecção por microorganismos, já que essas moléculas também são estranhas aos animais.

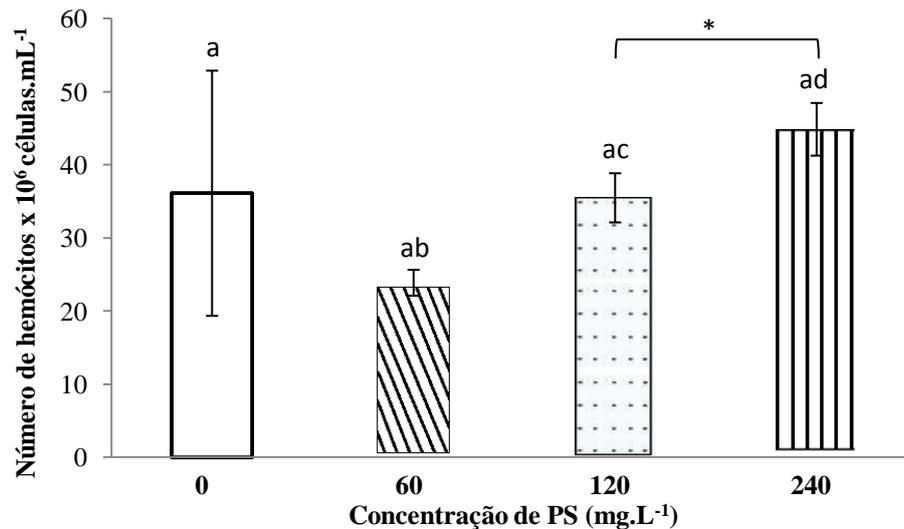


Figura 3. Contagem total de hemócitos (CTH) em juvenis de camarões *L. vannamei* três horas após o banho de imersão de PS de *S. platensis*. As barras representam à média \pm DP das contagens obtidas de 4 *pools* de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras representam diferenças significativas ($p \leq 0,01$) da CTH entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da CTH nas diferentes concentrações de PS na água.

Li; Yeh; Chen (2008) afirmam que a redução no número total de hemócitos circulantes e a diminuição na capacidade aglutinante do plasma são mais evidentes em camarões infectados ou estressados. O número de hemócitos circulantes cai após a infecção por microrganismos, já que esses hemócitos podem migrar para a região infectada e o número de HG pode ser reduzido devido ao processo de degranulação que resulta na liberação das moléculas imuno-efetoras (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

A redução no número de hemócitos circulantes devido às infecções altera drasticamente o número de hemócitos livres na hemolinfa, como resultado do direcionamento dos mesmos aos locais de infecção ou pela sua utilização na formação de nódulos e capsulas (SÖDERHÄLL *et al.*, 2003; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Quando o camarão marinho *L. vannamei* foi infectado com *V. alginoliticus*, foi verificada uma redução no número de hemócitos circulantes 12 h após a infecção, retornando aos valores basais apenas 72 h após a infecção (LI; YEH; CHEN, 2008). Desta forma, novos hemócitos são produzidos e liberados na circulação por parte do tecido hematopoiético dos animais para recompor os valores normais da CTH (VAN

DE BRAAK *et al.*, 2002; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006). Costa (2008) avaliou os parâmetros imunológicos de *L. vannamei* em diferentes estágios de infecção com o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) e verificou que a CTH e a CDH foram significativamente reduzidas com o aumento da severidade da infecção. Sarathi *et al.* (2007) verificaram uma redução de 50% na CTH em *Fenneropeneus indicus* 48 h após a infecção com o vírus da mancha branca (WSSV) e 100% de mortalidade nas 55 horas decorridas da infecção, enquanto a redução na CTH foi bem mais leve quando os animais foram infectados com o *V. alginolitycus*.

A redução na CTH após a infecção por WSSV está possivelmente relacionada à infiltração dos hemócitos no local da infecção, da baixa reposição celular pelo tecido hematopoiético ou apoptose (WONGPRASERT *et al.*, 2003). Já a redução de HG circulantes se deve ao fato dessas células serem as mais imunocompetentes, nas quais as moléculas imuno-efetoras também são armazenadas e, por isso, são as mais recrutadas pelo hospedeiro durante as infecções (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006).

Segundo Tayag *et al.* (2010), a utilização de um extrato obtido de *S. platensis* em camarões é uma forma de estimular o sistema imunológico de camarões. Os autores mostraram que os animais submetidos a uma concentração de 400 mg L⁻¹ do extrato, via banho de imersão, apresentaram um aumento de 55% na CTH e de 53% nos percentuais de HH e HG, após três horas de exposição.

Na contagem diferencial de hemócitos não foi verificada uma grande variação no percentual de hemócitos granulares (HG) e hialinos (HH) entre os tratamentos. Os camarões que foram submetidos ao banho de imersão com os PS na concentração de 60 mg L⁻¹ apresentaram a menor concentração média de HG (66 ± 3,92%), entretanto não houve diferença estatisticamente significativa comparada à concentração obtida no grupo controle (73,33 ± 6,35%), nem da obtida dos animais que foram expostos aos PS na concentração de 120 mg L⁻¹ (73,25 ± 6,24%) (Figura 4). Por outro lado, foi verificado um aumento significativo nas contagens de HG dos camarões expostos à concentração mais alta 240 mg L⁻¹ (76,5 ± 3,87%) quando comparadas as obtidas na concentração mais baixa (66 ± 3,92%) de PS na água. Esse fato reforça a hipótese de estímulo à produção de novos HG a partir da administração das doses mais elevadas dos PS na água e esta tendência de aumento já pôde ser observada a partir da concentração de 120 mg L⁻¹.

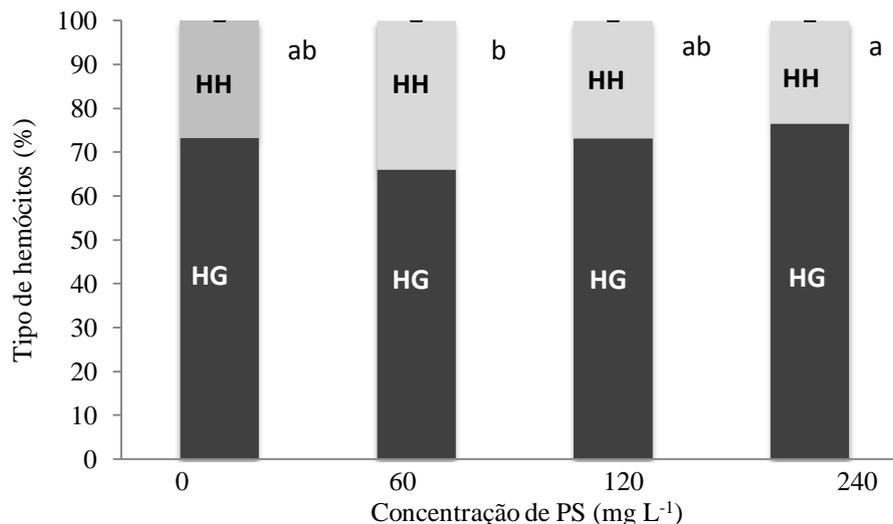


Figura 4: Percentual de hemócitos granulares e hialinos em *L. vannamei* submetidos ao banho de imersão com PS de *S. platensis* após três horas da administração. As barras representam a média \pm DP do percentual de HG em 4 *pools* de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as CDH nas diferentes concentrações de PS na água.

No trabalho de Lin *et al.* (2010), no qual os camarões foram submetidos ao banho de imersão com um extrato de *S. platensis* e, posteriormente, a um estresse induzido por pH baixo (6,8), durante três horas, foi verificado que a CTH aumentou com a elevação da concentração do extrato da mesma forma que as contagens de HH e HG. Os valores basais de CTH, HH e HG retornaram ao nível basal mais rapidamente (48 h) para as concentrações mais elevadas do extrato (400 e 600 mg L⁻¹), enquanto que na concentração mais baixa o retorno aos valores basais foi mais demorado (72 h).

Neste trabalho, os camarões do tratamento com a concentração mais baixa de PS de *S. platensis* na água se mostraram menos imunocompetentes, devido aos valores mais baixos de CTH e CDH, após o período experimental. Os resultados também sugerem que a imunocompetência dos camarões que foram expostos às concentrações mais elevadas de PS foi novamente estabelecida dentro de três horas, já que o número de hemócitos circulantes voltou a ser igual ao do grupo controle (Figura 4).

A literatura mostra que o número de hemócitos circulantes em camarões pode variar muito quando há infecção com diferentes tipos de patógenos e o retorno ao valor basal pode levar mais ou menos tempo, dependendo da carga do patógeno. Assim, o uso de imunostimulantes pode acelerar este retorno e, conseqüentemente, aumentar a imunocompetência dos animais. De forma geral, o número total de hemócitos

circulantes pode ser considerado uma ferramenta potencial para a avaliação do estado imunológico em crustáceos (SMITH; BROWN; HAUTON, 2003).

Outros estudos também demonstram a atividade imunoestimulante de extratos de macroalgas marinhas em camarões. Esses extratos foram obtidos da mesma forma do obtido da biomassa de *Spirulina* por Lin *et al.* (2010) e têm sido utilizados para avaliar vários imunoparâmetros em camarões *L. vannamei*.

Yeh *et al.* (2010) submeteram os camarões *L. vannamei* a um banho de imersão com o extrato obtido da macroalga marinha vermelha *Glacilaria tenuistipitata* após um estresse salino. Os autores observaram que os animais expostos à concentração de 600 mg L⁻¹ do extrato da macroalga apresentaram um menor decréscimo na CTH e CDH, seis horas após o estresse.

Fu *et al.* (2007) administraram o extrato da alga marinha vermelha *Gelidium amansii* a camarões *L. vannamei* antes de um desafio com o *Vibrio alginolyticus* e observaram que a CTH aumentou, independente se a forma de administração foi oral, por meio de injeção ou banho de imersão. Os resultados da CTH após a administração do extrato da macroalga, via banho de imersão, resultou em um aumento significativo no número de hemócitos dos camarões expostos as concentrações de 400 e 600 mg L⁻¹ do extrato na água, semelhante aos resultados encontrados por Lin *et al.* (2010) e Yeh *et al.* (2010).

Yeh; Lee e Chen (2006) também avaliaram os imunoparâmetros de *L. vannamei* desafiados com o *V. alginolyticus*, após a administração do extrato obtido da macroalga marinha parda *Sargassum duplicatum*, por meio do banho de imersão, injeção e oral. Os autores concluíram que, em todos os tratamentos, o número de hemócitos circulantes aumentou significativamente com aumento da concentração do extrato na água, independente da forma de administração.

De acordo com Sabry Neto (2007), a administração de β -1,3/1,6-glucano aos camarões infectados com o vírus da Mionecrose Infecçiosa (IMNV) reduziu significativamente a CTH, quando comparada a obtida dos animais infectados que não receberam o açúcar na dieta.

A determinação do hemograma (CTH e CDH) em crustáceos é uma ferramenta importante na avaliação do estado de saúde destes animais. De maneira semelhante ao hemograma em vertebrados, essa ferramenta reflete usualmente a presença de infecções, bem como alterações fisiológicas como, por exemplo, a ecdise e ablação de fêmeas, além de alterações de origem ambiental, tais como a variação de salinidade e hipóxia (MAGGIONI *et al.*, 2004; LIU; YEH; CHEN, 2008; PERAZZOLO *et al.*, 2002; LE MOULLAC; HAFNER, 2000; LE MOULLAC *et al.*, 1998).

5.4.2 Atividades da fenoxidase (PO) e do inibidor de protease α 2-macroglobulina (α -2M)

Foi verificada uma redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,01$) da atividade da PO nos camarões expostos aos PS de *S. platensis* na concentração de 60 mg L^{-1} em relação aos demais tratamentos. A atividade da PO dos animais que foram expostos a maior concentração de PS ($95,65 \pm 7,22$) foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) da obtida na concentração mais baixa ($79,97 \pm 4,09 \text{ U/min/mg}$) e não apresentou diferença significativa em relação à atividade obtida quando foi usada a concentração de 120 mg L^{-1} ($109,18 \pm 7,81 \text{ U/min/mg}$) que, por sua vez, não apresentou diferença em comparação à atividade observada para grupo controle ($117,22 \pm 2,80 \text{ U/min/mg}$) (Figura 5).

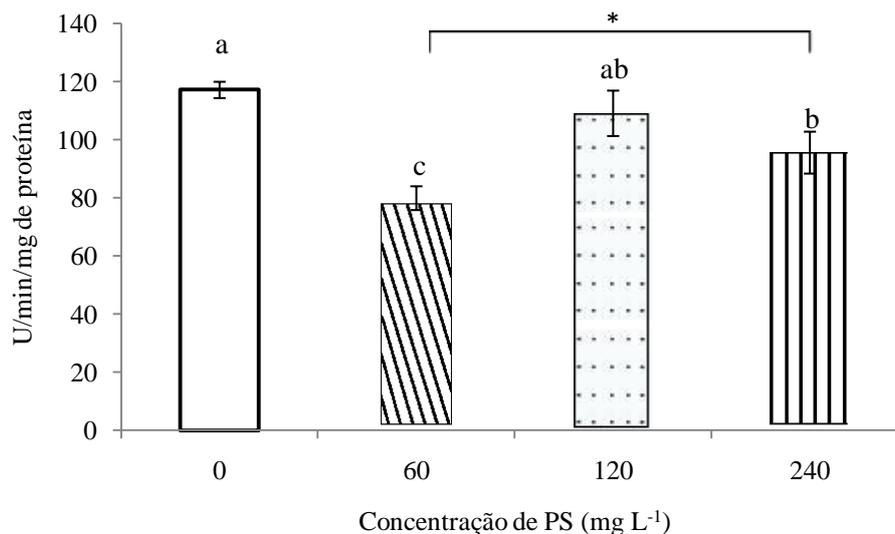


Figura 5: Atividade da fenoloxidase (PO) em *L. vannamei* três horas após a administração de PS de *S. platensis*. As barras representam \pm DP da atividade da PO em 4 *pools* de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da atividade da PO entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da atividade da PO nas diferentes concentrações de PS na água.

A atividade da α -2M apresentou valores maiores nos camarões que foram expostos a concentração mais baixa dos PS de *S. platensis* ($4,28 \pm 1,31$ U/min/mg) e foi significativamente maior quando comparada a do grupo controle ($0,92 \pm 0,26$ U/min/m), mas não apresentou diferença estatística ($p \leq 0,01$) ao ser comparada a dos animais expostos a maior concentração de PS ($2,62 \pm 0,28$ U/min/mg). Por outro lado, a atividade da α -2M dos camarões expostos a concentração de 120 mg L^{-1} foi a mais baixa e não apresentou diferença em relação à obtida nos animais do grupo controle (Figura 6).

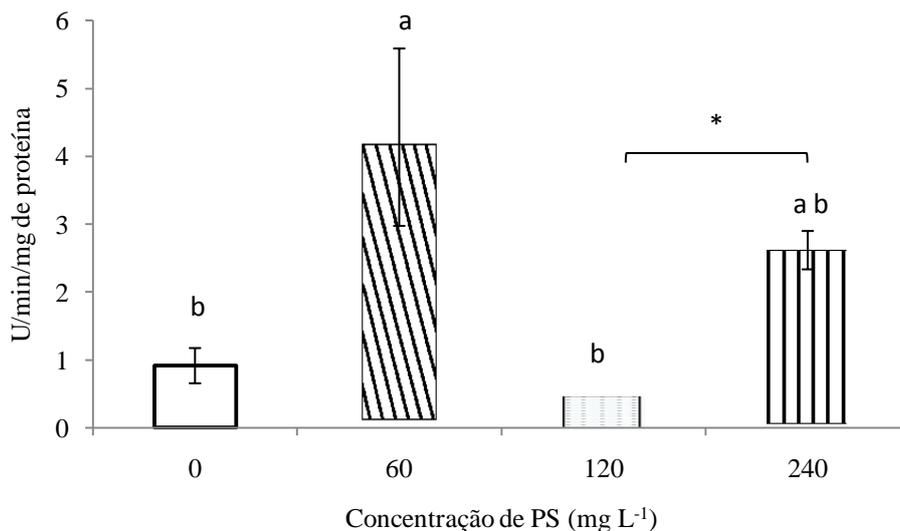


Figura 6: Atividade da α 2-Macroglobulina (α 2-M) em *L. vannamei* três horas após a administração de PS de *S. platensis* por banho de imersão. As barras representam à média \pm DP da atividade da α 2-M em 4 *pools* de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da α 2-M entre os tratamentos. Asterisco representa diferença significativa ($p \leq 0,05$) da α 2-M nas diferentes concentrações de PS na água.

No presente estudo, a redução da atividade da PO nos camarões expostos a concentração de 60 mg L⁻¹ (Figura 5) pode ter sido reflexo do menor número de hemócitos circulantes nesse tratamento (Figuras 3 e 4) e a baixa reposição pelo tecido hematopoiético, já que os hemócitos armazenam as moléculas precursoras do sistema PO, entre outras moléculas imuno-efetoras (PERAZZOLO; BARRACCO, 1997 e CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2004).

Por outro lado, o alto valor da atividade da α 2-M observado nos animais expostos a concentração de 60 mg L⁻¹ dos PS de *S. platensis* (Figura 6) limitou a ativação do sistema proPO dos camarões, justificando também os baixos valores da atividade da PO nessa concentração em comparação com a dos animais do controle (Figura 5). Da mesma forma, na maior concentração de PS (240 mg L⁻¹), a atividade da α 2-M foi semelhante e reduziu a atividade da PO nessa concentração, que também foi significativamente menor da obtida no controle, no entanto foi maior da obtida na menor concentração de PS na água (60 mg L⁻¹), reforçando a hipótese de um maior estímulo do tecido hematopoiético nas concentrações mais elevadas que influenciaram no aumento da atividade da PO.

A ativação do sistema proPO deve ser regulada na intenção de evitar uma ativação indesejada ou generalizada, que pode causar grandes danos ao próprio

hospedeiro. Para isso os animais possuem inibidores de protease tanto no plasma quanto nos hemócitos, tais como a *pacifastina* (LIANG; SOTTRUP-JENSEN; SÖDERHÄLL, 1997), os inibidores da família Kazal (SOMPRASONG; RIMPHANITCHAYAKIT; TASSANAKAJON, 2006) e Kunitz, as serpinas (LIANG; SÖDERHÄLL, 1995); a α 2-macroglobulina (HERGENHAHN; HALL; SÖDERHÄLL, 1998; KANOST, 1999) e inibidores de metalo-protease (WEDDE *et al.*, 1998). Esses inibidores também são capazes de agir nas proteases exógenas produzidas durante o processo infeccioso (ARMSTRONG, 2006).

A atividade da PO nos camarões expostos a concentração intermediária dos PS de *S. platensis* (120 mg L^{-1}) voltou a ser elevada e semelhante a obtida no controle (Figura 5) decorrente do maior número de hemócitos circulantes (Figuras 3 e 4) e, principalmente, devido à reduzida atividade da α 2-M nessa mesma concentração (Figura 6). Nessa concentração, de acordo com os resultados, não houve necessidade de regulação da atividade da PO pelo inibidor de protease, mantendo esses níveis semelhantes aos observados no controle.

A administração de imunostimulantes em momentos de elevada infecção pode ser prejudicial ao organismo, visto que já existe um estado de alerta imunológico com o sistema de inibição da protease já ativado para evitar danos ao próprio hospedeiro. Esse comportamento pode ser observado na administração das doses de 60 e 240 mg L^{-1} dos PS de *S. platensis* aos juvenis de *L. vannamei*, quando houve necessidade de regulação do sistema PO pela α 2-M (Figuras 5 e 6).

Sabry Neto (2007) não observaram diferenças significativas na atividade da PO em camarões infectados com o vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), submetidos ou não ao tratamento com β -glucanos e vitamina C, porém neste caso, os autores não avaliaram a atividade do inibidor de protease.

Cantelli (2009) observou que a atividade da α 2-M aumentou três dias após a infecção com o vírus da mancha branca, principalmente para os indivíduos que não foram tratados com os PS de *G. birdiae*, e no 14º dia após a infecção, esses valores se aproximaram aos valores basais, resultando no aumento da atividade da enzima fenoloxidase (PO).

A atividade da enzima PO é um imunoparâmetro comumente utilizado para avaliar o estado de saúde de camarões (RODRÍGUEZ; LE MOULLAC, 2000). Quando o organismo é infectado, esses corpos estranhos se ligam diretamente aos HG ou através de PRP's plasmáticas e induzem uma degranulação ou exocitose regulada, liberando várias moléculas efetoras, entre elas as do sistema proPO, que é ativado por esses próprios microrganismos (BARRACCO, PERAZZOLO; ROSA, 2008).

A exposição dos camarões aos PS de *S. platensis* causou um efeito semelhante à exposição a um patógeno, no entanto esse efeito foi diferente dependendo da concentração utilizada, reduzindo a atividade da PO na menor concentração (60 mg L⁻¹) e mantendo essa atividade semelhante ao controle, a partir da concentração de 120 mg L⁻¹ (Figura 5). No entanto, só houve necessidade de regulação pela α 2-M quando os animais foram expostos as concentrações de 60 e 240 mg L⁻¹ (Figura 6). Na realidade, essa regulação também deve ter ocorrido, em um primeiro momento, na concentração de 120 mg L⁻¹, mas voltou a cair dentro das três horas, ou seja os valores da PO nessa concentração não chegaram a ser prejudiciais aos animais, diferente do que provavelmente ocorreu na concentração de 240 mg L⁻¹, que possivelmente aumentou muito a atividade da PO, necessitando manter elevados os valores do inibidor dentro das três horas do experimento.

Lin *et al.* (2010) verificaram que os valores da atividade da enzima fenoxidase nos camarões *L. vannamei* aumentou proporcionalmente com a elevação da concentração do extrato de *S. platensis* na água.

Tayag *et al.* (2010) avaliaram a administração do extrato de *S. platensis* via banho de imersão e injeção em camarões marinhos *L. vannamei* desafiados com víbrio e verificaram que houve um aumento significativo na atividade da PO, independente da forma de administração, nas concentrações mais altas do extrato, principalmente no caso do banho de imersão.

Estudos que analisaram a expressão gênica da α 2-M mostraram que a sua expressão foi aumentada 48 h após o desafio com vírus (TONGANUNT *et al.*, 2005) ou após o tratamento com dos animais com LPS e PGs bacterianos (VASEEHARAN *et al.*, 2007; LIN *et al.*, 2007; 2008). Estes dados sugerem que a α 2-M possa participar das respostas imunológicas dos crustáceos, direta ou indiretamente, sendo ainda capaz de

inibir as proteases dos patógenos ou inibindo a ativação do sistema proPO, minimizando a ação maléfica do patógeno como também os danos aos hospedeiro pela ativação exagerada deste sistema.

5.4.3 Concentração de proteínas totais (CP) no soro

A concentração de proteínas totais no soro dos camarões aumentou significativamente, em relação ao controle, quando os animais foram expostos aos PS de *S. platensis* independente da concentração utilizada. A CP mais baixa foi verificada no grupo controle ($83,63 \pm 4,18 \text{ mg.L}^{-1}$) e o maior valor de CP foi encontrado na concentração mais baixa de PS ($105,15 \pm 5,26 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo significativamente diferente ($p \leq 0,05$) quando comparada aos demais tratamentos (Figura 7).

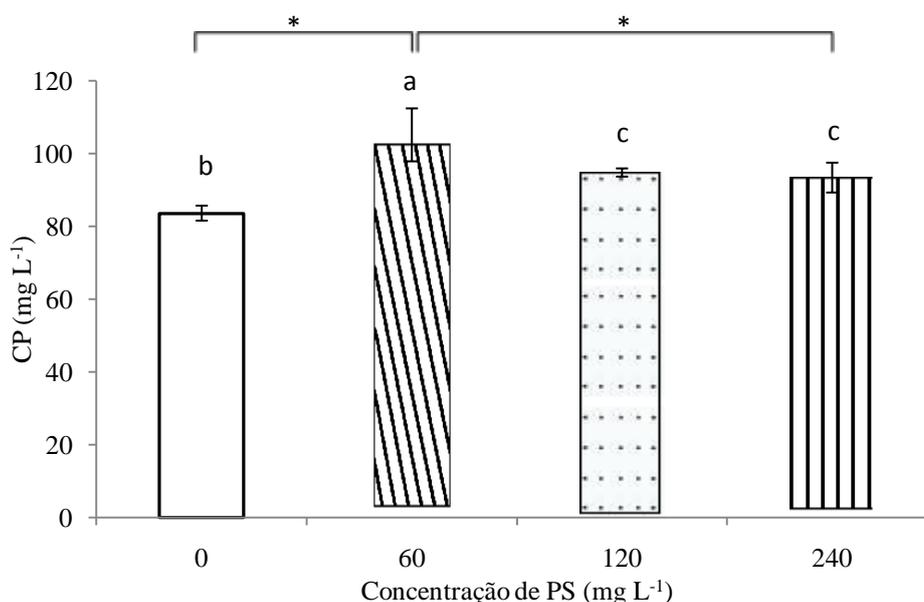


Figura 7: Concentração protéica totais no soro (CP) em *L. vannamei* três horas após a administração de PS de *S. platensis*. As barras representam as médias \pm DP da CP em 4 *pools* de 5 camarões/tratamento. Letras diferentes sobre as barras de erro representam diferença significativa ($p \leq 0,05$) da CP entre os tratamentos. Asteriscos representam diferença significativa ($p \leq 0,01$) da CP nas diferentes concentrações de PS na água.

Cantelli (2009) observou que a concentração de proteínas totais não variou entre os animais tratados ou não com o PS de *G. birdiae* e desafiados ou não com o vírus da manha branca (WSSV). Porém a CP apresentou um ligeiro aumento para os camarões

não tratados com PS e desafiados com o vírus para o terceiro dia após a infecção ($63,56 \pm 9,42 \text{ mg.L}^{-1}$). De forma semelhante ao 14º dia após a infecção a CP ($80,6 \pm 17,20 \text{ mg.L}^{-1}$) se mostrou maior para esse mesmo tratamento, no entanto, inferiores os valores obtidos no presente estudo. Costa (2008) cita valores mais altos, variando de 105,5 a 141 mg.L^{-1} , para animais desafiados com o IMNV.

O aumento da CP no soro dos animais expostos a menor (60 mg L^{-1}) e maior concentração (240 mg L^{-1}) dos PS de *S. platensis* pode ser justificada tanto pela ativação do sistema PO quanto pelo aumento da atividade da α 2-M, enquanto o aumento observado na concentração intermediária (120 mg L^{-1}) pode ser explicado pela elevada atividade da PO.

5.4.4 Atividade hemaglutinante da hemolinfa

A capacidade hemaglutinante do soro de *L. vannamei* avaliada três horas após a administração do PS – EQA, praticamente não foi alterada entre os tratamentos. Apesar de o tratamento com a maior concentração do composto (240 mg L^{-1}) ter apresentado uma tendência de aumento da capacidade hemaglutinante do soro dos camarões, mesmo assim não foi verificada diferença estatística significativa (Figura 8).

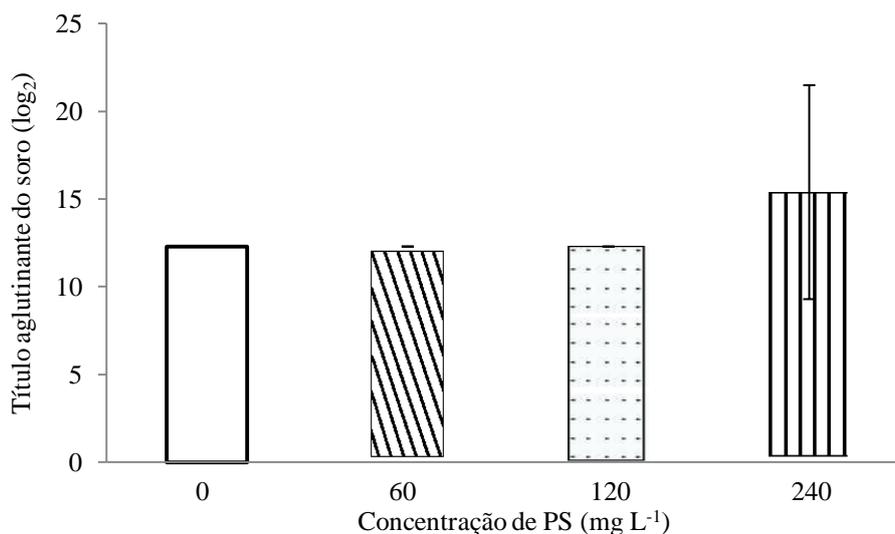


Figura 8: Atividade hemaglutinante do soro dos camarões, contra eritrócitos de coelho em *L. vannamei*, três horas após a administração de PS de *S. platensis* via banho de imersão. As barras representam a média \pm DP da atividade aglutinante do soro (4 pools de 5 camarões) nas diferentes concentrações de PS na água.

As lectinas presentes no soro dos crustáceos fazem parte das proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) com a capacidade de se ligar especificamente a carboidratos da superfície de patógenos, causando uma aglutinação (MARQUES; BARRACCO, 2000). Costa (2008) evidenciou um aumento da capacidade hemaglutinante em camarões marinhos *L. vannamei* que apresentavam um grau severo de infecção com o IMNV. Segundo Barracco; Perazzolo e Rosa (2008) podem ocorrer variações no título aglutinante da hemolinfa de crustáceos, quando submetidos a condições de estresse ou em infecções por patógenos. A tendência no aumento da atividade aglutinante na maior concentração de PS de *S. platensis* pode estar relacionada com um excessivo efeito imunoestimulante dessas moléculas em altas doses.

Com a realização do presente trabalho, ficou evidente uma atividade imunomodulatória dos PS de *S. platensis* em camarões *L. vannamei*, devido às variações observadas nos imunoparâmetros, após a administração de diferentes doses dos polímeros na água. A administração de uma dose muito baixa (60 mg L⁻¹) pode reduzir as defesas dos animais por não ser capaz de estimular o sistema imunológico. A duplicação da dose foi capaz de manter as defesas dos camarões, no entanto, a administração de uma dose elevada (240 mg L⁻¹) pode ser prejudicial devido a uma excessiva ativação dos sistema imunológico que pode trazer problemas para os próprios camarões. Assim, em situações de estresse, quando as defesas dos camarões

estão reduzidas, a administração de uma dose correta dos PS de *S. platensis* pode fazer com que os animais retornem, rapidamente, a um estado de imunológico mais competente.

Mais estudos estão sendo conduzidos com a biomassa de *S. platensis*, principalmente no tocante à sua incorporação na própria ração dos camarões para a determinação de uma concentração ideal que possa manter os animais sempre em um bom estado de imunocompetência. Estas moléculas simulam uma infecção e ativam o sistema imunológico inato dos animais, no entanto não causam doenças, deixando os animais mais resistentes a situações reais de estresse.

6 CONCLUSÕES

Após a realização deste estudo, conclui-se que:

- I. A introdução da precipitação alcoólica na obtenção dos PS de *S. platensis* elevou significativamente o percentual de açúcar no extrato;
- II. Foi possível realizar o fracionamento dos PS de *S. platensis* utilizando uma coluna de DEAE-celulose em duas frações principais com alta atividade metacromática e diferentes teores de açúcar;
- III. As PL's de *L. vannamei*, submetidas ao teste de estresse salino, apresentaram uma tendência de menor mortalidade, quando foram expostas a concentração intermediária dos PS de *S. platensis*;
- IV. A exposição dos camarões aos PS de *S. platensis* não alterou significativamente a capacidade aglutinante do soro dos animais, que apenas mostrou uma ligeira tendência de aumento na maior concentração utilizada.
- V. A concentração intermediária de 120 mg L⁻¹ é a mais indicada para o uso dos PS de *S. platensis* como imunoestimulante, pois além de manter os níveis normais de hemócitos circulantes e a atividade basal do sistema PO, não houve necessidade de regulação pela α 2-M.

REFERÊNCIAS

- ABDULQADER, G.; BARSANTI, L.; TREDICI M. R. **Harvest of *Arthrospira platensis* from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu**, Dordrecht, v. 12, n. 3-5, p. 493-498. Oct. 2000.
- 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.
- ANDREWS, S. R.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; MUKHERJEE, S. C.; KUMAR, S. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge, **Research in Veterinary Science**, Oxon, v. 91, n. 1, p. 103-109, Aug. 2011.
- ARMSTRONG, P. B. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction. **Immunobiology**, Jena, v. 211, n. 4, p. 263-281, Jun. 2006.
- AUBREY, S. M. Spirulina: answer for the hungry. Disponível em: <<http://www.familyhealthnews.com/alternative-health-information/natural-plants-bacteria/spirulina-answer-for-the-hungry.html>>. 2006. Acessado em agosto de 2010.
- BACHÈRE, E.; GUEGUEN, Y.; GONZALEZ, M.; de LORGERIL, J.; GARNIER, J.; ROMESTAND, B. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 149-168, Apr. 2004.
- BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. N. Camarões marinhos – Reprodução, Maturação e Larvicultura. 1. ed. Viçosa. **Aprenda Fácil**, 255p, 2001.
- BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A.N. Camarões marinhos – Engorda. 1. ed. Viçosa. **Aprenda Fácil**, 352p, 2002.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunologia del Camarón. In: VIELKA, M. Q.; CUÉLLAR-ANJEL, J. (Eds.), *Guía Práctica de Patología y Inmunología de Camarones Penaeidos*, **ED. CYTED**, p.169-224, 2008.
- BARROSO, F. E. C.; RODRIGUES, J. A. G.; TORRES, W. M.; SAMPAIO, A. H.; FARIAS, W. R. L. Efeito do polissacarídeo sulfatado extraído da alga marinha vermelha *Botryocladia occidentalis* nas pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei*. **Revista Ciência Agrônômica**, v,38, n.1, p.58-63, 2007.
- BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors - The Earthrise Farms experience. In: Vonshak, A. ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biochemistry***. London: Ed. Taylor and Francis. 1997, capítulo 8, p. 131-158.

- BELAY, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. **The Journal of the American Nutraceutical Association**, v. 5, n. 2, p. 27-48, 2002.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**, Londres, v. 12, n. 5, p. 64-76, Out. 2000.
- BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.249-254, 1976.
- BULET P.; STÖCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 198, n. 1, p. 169-184, Apr. 2004.
- CAMPA-CÓRDOVA, A. I.; HERNÁNDEZ-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 -glucan and sulphated polysaccharide **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 12, n. 4, p. 353-366, Apr. 2002.
- CANTELLI, L. **Avaliação do efeito de polissacarídeos sulfatados da macroalga *Gracilaria birdie* sobre as condições de imunocompetência de camarões *Litopenaeus vannamei* infectados com o vírus dasíndrome da mancha branca (WSSV)**. 2009. 68f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- CARNEIRO, D. O.; FIGUEIREDO, H. C. P.; PEREIRA JÚNIOR, D. J.; LEAL, C. A. G.; LOGATO, P. V. R. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em diferentes sistemas de cultivo de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizontde, v. 59, n. 4, p. 869-876, ago. 2007.
- CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v.198, n. 1, p.116-126, Apr. 2004.
- COSTA, A. M. **Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vanname* durante o avanço da infecção pelo vírus da monecrose infecciosa (IMNV)**, 2008. 51f. Dissertação (Pós-graduação em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- COSTA, R. A.; VIEIRA, G. H. F.; SILVA, G. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; SAMPAIO, S. S. Susceptibilidade "in vitro" a antimicrobianos de estirpes de *Vibrio* spp isoladas de camarões (*Litopenaeus vannamei*) e de água de criação destes animais provenientes de uma fazenda de camarões no Ceará Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 45, n. 6, p. 458-462, abr. 2008.
- DERNER, R. B. **Cultivo de microalgas. In: Produção de camarão marinho**. Florianópolis: UFSC,1996, p. 64-75. 1996.

- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, nov./dez. 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 28, n. 3, p.350-354, 1956.
- DUNCAN, P.; KLESIUS, P. Effects of *Spirulina* on specific and non-specific immune responses of channel catfish. **Journal Aquatic and Animal Health**. v. 8, p. 308-313, 1996.
- ELLIS, R. P.; PARRY, H.; SPICER, J. I.; HUTCHINSON, T. H.; PIPE, R. K.; WIDDICOMBE, S. Immunological function in marine invertebrates: Responses to environmental perturbation. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 30, n. 6, p. 1209-1222, Jun. 2011.
- FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. FISHSTAT, ROMA, 2010.
- FEARON, D. T. Seeking wisdom in innate immunity. **Nature**. Londres, v. 388, n. 6640, p. 323-324. Jul. 1997.
- FU, Y. W.; HOU, W. Y.; YEH, S. T.; LI, C. H.; CHEN, J. C. The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**. Londres, v. 22, n. 6, p 673-685, Jun. 2007.
- GARGIONI, R.; BARRACCO, M. A. Hemocytes of the palaemonids *Macrobrachium rosenbergii* and *M. acanthurus*, and of the penaeid *Penaeus paulensis*. **Journal of Morphology**, Nova York, v. 236, n. 3, p. 209-221, Jun. 1998.
- GOPALAKANNAN, A.; ARUL, V. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. **Aquaculture**. Amsterrdam, v, 255, n. 1-4, p 179-187. May. 2006.
- GROSS, P. S.; BARTLETT, T. C.; BROWDY, C. L.; CHAPMAN, R. W.; WARR, G. W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 25, n. 7, p. 565-577. 2001.
- HARIKRISHNAN, R.; BALASUNDARAM, C.; JAWAHAR, S.; HEO, M. S. *Solanum nigrum* enhancement of the immune response and disease resistance of tiger shrimp, *Penaeus monodon* against *Vibrio harveyi*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 318, v. 1-2, p. 67-73, Jul. 2011.

HAYASHI, O.; HIRAHASHI, T.; KATOH, T.; MIYAJIMA, H.; HIRANO, T.; OKUWAKI, Y. Class specific influence of dietary *Spirulina platensis* on antibody production in mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, Tokyo, v. 44, n. 6, p. 841-851, Dec. 1998.

HAYASHI, T.; HAYASHI, K.; MAEDA, M.; KOJIMA, I. Calcium spirulan, an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue green alga *Spirulina platensis*. **Journal of Natural Products** Cincinnati, v. 59, n. 1, p. 83-87, Jan. 1996.

HERGENHAHN, H. G.; HALL, M.; SÖDERHÄLL, K. Purification and characterization of an alpha2-macroglobulin-like proteinase inhibitor from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **The Biochemical Journal**. Londres, v. 255, n. 3, p. 801-806, Nov. 1988.

HERNÁNDEZ-CORONA, A.; NIEVES, I.; MECKES, M.; CHAMORRO, G.; BARRON, B. L. Antiviral activity of *Spirulina maxima* against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, Amsterdam, v. 56, n. 3, p. 279-285, Dec. 2002.

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M., HAZEKI, K., SAEKI, Y.U.I.M., SEYA, T., Activation of the human innate immune system by Spirulina: augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of *Spirulina platensis*. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, n. 4, p. 423-434, Mar, 2002.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOA, F. C.; JANEWAY, JR. C. A.; EKEKOWITZ, R. A. B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1313-1318, May. 1999.

HOLMSTROM, K.; GRASLUND, S.; WAHLSTROM, A. ; POUNGSHOMPOO, S.; BENGTTSSON, B. E.; KAUTSKY, N. Antibiotic use in shrimp farming and implications for environmental impacts and human health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxon, v. 38, n. 3, p. 255-266, Mar. 2003.

HOSE, J. E.; MARTIN, G. G.; GERARD, A. S. A decapod hemocyte classification scheme integrating morphology, cytochemistry, and function. **Biological Bulletin**, Woods Hole, v. 178, n. 1, p. 33-45, Feb. 1990.

HUANG, X.; ZHOU, H.; ZHANG, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 20, n. 5, p. 750-757, May. 2006.

IWANAGA, S.; LEE, B. L. Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. **Biochemistry and Molecular Biology**, Singapura, v. 38, n. 2, p. 128-150, Mar. 2005.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, California, v. 20, p. 197-216, Apr. 2002.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B. L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization.

Immunobiology, Jena, v.211, n. 6, p. 213-236, Jun. 2006.

JOHANSSON, M. W.; KEYSER, P.; SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 45-52, Nov. 2000.

KANOST, M. R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental and Comparative Immunology**. Oxford, v. 23, n. 7, p. 291-301, Jun./Jul. 1999.

KRUMMENAUER, D.; WASIELESKY, W. J.; CAVALLI, R. O.; PEIXOTO, S.; ZOGBI, P. R. Viabilidade do cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Crustácea, Decapoda) em gaiolas sob diferentes densidades durante o outono no sul do Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 252-257, jan./feb. 2006.

LEE, Y. K.; CHEW, P.F.; SOH, B.S.; THAM, L. Y. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prawn *Penaeus mergueneis* by feeding *Spirulina platensis*. **Journal Applied of Phycology**, GZ Dordrecht, v. 15, n. 4, p. 279-287, Jul. 2003.

LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Early events in crustacean innate immunity. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 12, n. 5, p. 421-437, May. 2002.

LE MOULLAC, G.; HAFNER, P. Enviromental factors affecting immune responses in Crustacea. **Aquaculture**, Amsterdam, v.191, n. 1-3 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 and Shellfish Immunology**, Londres, v.8, n. 8, p. 621-629, Nov. 1998.

LI, C. C.; CHEN, J. C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under low and high pH stress. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 25, n. 6, p. 701-709, Dec. 2008.

LI, C. C.; YEH, S. T.; CHEN, J. C. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 25, n. 6, p. 853-860, Dec. 2008.

LIANG, Z.; SÖDERHÄLL, K. Isolation of cDNA encoding a novel serpin of crayfish hemocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 2: 385-391. 1995.

LIANG, Z.; SOTTRUP-JENSEN, L.; SÖDERHÄLL, K. Pacifastin, a novel 155-kDa heterodimeric proteinase inhibitor containing a unique transferrin chain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington v. 94, n. 13, p. 6682-6687, Jun. 1997.

LIMA, P. C. W. de C. Efeito da administração dos polissacarídeos sulfatados extraídos da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* em juvenis e pós-larvas

do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2007. Dissertação (Pós-graduação em Engenharia de Pesca) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

LIN, Y. G.; TAYAG, C. M.; HUANG, C. L.; TSUI, W. C.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. **Fish and Shellfish Immunology**. Londres, v. 29, n. 6, p. 1092-1098, Nov. 2010.

LIN, Y. C.; VASEEHARAN, B.; KO, C. F.; CHEN, J. C. Molecular cloning and phylogenetic analysis on α 2-macroglobulin (α 2-M) of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 317-329, 2008.

LIN, Y. C.; VASEEHARAN, B.; KO, C. F.; CHIOU, T. T.; CHEN, J. C. Molecular cloning and characterisation of a proteinase inhibitor, alpha 2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 1065-1074. Feb. 2007.

MAGGIONI, D. S.; ANDREATTA, E. R.; HERMES, E. M.; BARRACCO, M. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 241, n. 1-4, p. 501-515, Nov. 2004.

MARQUES, M. R. F.; BARRACCO, M. A. Lectins, as non-self recognition factors, in crustaceans. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 191, n. 1-3, p. 23-44, Nov. 2000.

MARTIN, G. G.; HOSE, J. E.; MINKA, G.; ROSENBERG, S. Clearance of bacteria injected into the hemolymph of the ridgeback prawn, *Sicyonia ingentis* (Crustacea: Decapoda): Role of hematopoietic tissue. **Journal of Morphology**, Nova York, v. 227, n. 2, p. 227-233, Feb. 1996.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a non-clonal system of recognition. **Cell**, Massachusetts, v. 91, n. 3, p. 295-298, Oct. 1997.

MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 31, n.8, p. 1075-1079, Aug. 1998.

MUÑOZ, M.; VANDENBULCKE, F.; SAULNIER, D.; BACHÈRE, E. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp. **European Journal of Biochemistry**, Malden, v. 269, n. 11 p. 2678-2689, Jun. 2002.

MURPHY, M. P; PACKER, M. A.; SCARLETT, J. L.; MARTIN, S. W. Peroxynitrite: A Biologically Significant Oxidant. **General Pharmacology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 179-186, 1998.

NAPPI, A. J.; OTTAVIANI, E. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. 469-480, May. 2000.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune-reactions. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, v. 6, n. 3, p. 117-126. Jun. 1993.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com a mortalidade decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 83, p. 37-51, 2004.

OSTRENSKY, A. **Estudos para viabilização dos cultivos comerciais de camarões marinhos no litoral do Estado do Paraná, Brasil**. 1997. 235 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

PERAZZOLO, L. M.; BARRACCO, M. A. The prophenoloxidase activating system of the shrimp, *Penaeus paulensis* and associated factors. **Developmental and Comparative Immunology**. Oxford, v. 21, n. 5, p. 385-395, Sep./Oct. 1997.

PERAZZOLO, L. M.; GARGIONI, R.; OGLIARI, P.; BARRACCO, M. A. A. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. **Aquaculture**, Amsterdam, v.214, n. 1-4, p.19-33, Nov. 2002.

RAA, J. The use of immune-stimulants in fish and shellfish feeds. In: AVANCES EM NUTRICIÓN ACUÍCOLA MEMORIAL DEL V SIMPOSIUM INTERNACIONAL DE NUTRICIÓN ACUÍCOLA. Yucatán. Mérida, p. 47-56. 2000.

RAHMAN M. M.; ESCOBEDO-BONILLA, C. M.; WILLE, M.; ALDAY SANZ, V.; AUDOORN, L.; NEYTS, J. Clinical effect of cidofovir and a diet supplemented with *Spirulina platensis* in white spot syndrome virus (WSSV) infected specific pathogen-free *Litopenaeus vannamei* juveniles. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 255, n. 1-4, p. 600-605, May. 2006.

RATTANACHAI, A.; HIRONO, I.; OHIRA, T.; TAKAHASHI, Y.; AOKI, T. Molecular cloning and expression analysis of alpha2-macroglobulin in the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 16, n. 5, p. 599-611. May. 2004.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 24, n. 6, p. 536-547, Dec. 2004.

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: Processos Tecnológicos, Impactos Sócio-Econômicos, Sustentabilidade Ambiental, Entraves e Oportunidades, **Revista ABCC**, jun. 2011. Disponível em:< <http://www.abccam.com.br/abcc/publicacoes>>. Acessado em agosto de 2011.

ROCHA, I. P.; RODRIGUES, J.; AMORIM L. Aquicultura Brasileira em 2003. **Revista da ABCC**, Recife, ano 6, n.1, p 30-36, 2004.

RODRIGUES, J. A. G; JÚNIOR, J. S. J; MOREIRA, P. L; MELO, D. S.; LOURENÇO, J. A.; LIMA, P. C. W. C.; TORRES, V. M.; PONTES, G. C.; FARIAS, W. R. L.

Avaliação dos efeitos da imersão de pós-larvas do camarão *Litopenaeus vannamei* em águas de cultivo com polissacarídeos sulfatados. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 3, n. 2, p. 80-91, 2008.

RODRÍGUEZ, J.; LE MOULLAC, G. State of the art of immunological tools and health control of penaeid shrimp. **Aquaculture**. Amsterdam, v.191, n. 1-3, p.109-119, Nov. 2000.

SABRY NETO, H. **Desempenho e resistência imunológica do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com uma dieta rica em β -1,3/1,6-glucano e ácido L-ascórbico-2-monofosfatado frente ao vírus da mionecrose infecciosa (IMNV)**. 2007. 66f. Dissertação (Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, Fortaleza, 2007.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**. Amsterdam, v, 172, n. 1-2, p. 63-69. Mar. 1999.

SARATHI, M.; AHMED, V. P. I.; VENKATESAN, C.; BALASUBRAMANIAN, G.; PRABAVATHY, J.; HAMEED, A. S. S. Comparative study on immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 271, n. 1-4, p. 8-20, Oct. 2007.

SHARMA, M. K.; PATNI, R.; KUMAR, M.; KUMAR, A. Modification of mercury-induced biochemical alterations in blood of Swiss albino mice by *Spirulina fusiformis*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 289-296, Sep. 2005.

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

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

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

SÖDERHÄLL, I.; BANGYEEKHUN, E.; MAYO, S.; SÖDERHÄLL, K. Hemocyte production and maturation in an invertebrate animal; proliferation and gene expression in hematopoietic stem cells of *Pacifastacus leniusculus*. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 661-672, Sep. 2003.

SOMPRASONG, N.; RIMPHANITCHAYAKIT, V.; TASSANAKAJON, A. A five-domain Kazal-type serine proteinase inhibitor from black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its inhibitory activities. **Developmental and Comparative Immunology**, Oxford, v. 30, n. 11, p. 998-1008, 2006.

SONG, Y. L.; HUANG, C. C. **Application of immunostimulants to prevent shrimp diseases.** In: FINGERMAN, M.; NAGABHUSHANAM, R. Ed. Recent Advances in Marine Biotechnology. Science Publishers. p. 173-188, 2000.

TAYAG C. M; LIN Y-C; LI C-C; LIOU C-H; CHEN, J-C. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 28, n. 5-6, p. 764-773, 2010.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, Hoboken, v. 80, n. 6, p. 717-735, 2005.

TONGANUNT, M.; PHONGDARA, A.; CHOTIGEAT, W.; FUJI, K. Identification and characterization of syntenin binding protein in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 120, n. 2, p. 135-145, Nov, 2005.

TSING, A, ARCIER, J. M, BREHE`LIN, M. Haemocytes of penaeids and palaemonid shrimps: morphology, cytochemistry and hemograms. **Journal of Invertebrate Pathology**, São Diego, v. 53, n. 1, p. 64-77, Jan. 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**, Londres, v.12, n. 3, p. 253-272, Mar. 2002.

VASEEHARAN, B.; LIN, Y. C.; KO, C. F.; CHIOU, T. T.; CHEN, J. C. Molecular cloning and characterisation of a thioester-containing alpha2-macroglobulin (alpha2-M) from the haemocytes of mud crab *Scylla serrata*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 22, p. 115-130, Jan./Feb. 2007.

YEH, S. T.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed earlier recovery in immunity after a *Vibrio alginolyticus* injection. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 26, n. 5, p. 724-730, May. 2009.

YEH, S. T.; LEE, C. S.; CHEN, J. C. Administration of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum duplicatum* via immersion and injection enhances the immune resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v. 20, n. 3, p. 332-345, Mar. 2006.

YEH, S.T.; LIN, Y. C.; HUANG, C. L.; CHEN, J. C. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. **Fish and Shellfish Immunology**, Londres, v.28, n. 5-6, p.887-894, May-Jun. 2010.

WASIELESKY, W. J. **Cultivo de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Decapoda, Penaeidae) no estuário da Lagoa dos Patos: efeitos dos parâmetros ambientais.** 2000. 199f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Departamento de Oceanologia, Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

WATANUKI, H.; OTA, H.; TASSAKKA, A. C. M. A. R.; KATO, T.; SAKAI, M.
Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*.
Aquaculture, Amsterdam, v. 258, n. 1-4, p. 157-163, Aug. 2006.

WARNER, H. R. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 249-258, Sep. 1994.

WEDDE, M.; WEISE, C.; KOPACEK, P.; FRANKE, P.; VILCINSKAS, A.
Purification and characterization of an inducible metalloprotease inhibitor from the hemolymph of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **European Journal of Biochemistry**, Nova York, v. 225, n. 3, p. 535-543, Aug. 1998.

WONGPRASERT, K.; KHANOBDEE, K.; GLUNUKARN, S. S.; MEERATANA, P.;
WITHYACHUMNARNKUL, B. Time-course and levels of apoptosis in various tissues
of black tiger shrimp *Penaeus monodon* infected with white-spot syndrome virus.
Diseases of Aquatic Organisms, Oldendorf Luhe v. 55, n. 1, p. 3-10, Jun. 2003.