

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

ANA CECILIA GOMES SILVA

**Susceptibilidade do Camarão Rosa *Farfantepenaeus subtilis*
(Pérez-Farfante, 1967) ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)**

**FORTALEZA-CE
2009**

ANA CECILIA GOMES SILVA

**Susceptibilidade do Camarão Rosa *Farfantepenaeus subtilis*
(Pérez-Farfante, 1967) ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV)**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientadora: Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, PhD.

**FORTALEZA-CE
2009**

S578s Silva, Ana Cecília Gomes
Susceptibilidade do Camarão Rosa *Farfantepenaeus subtilis*
(Pérez-Farfante, 1967) ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).
Ana Cecília Gomes silva. 2009.
52 f.; Il. Color. enc.

Orientadora: Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, PhD.
Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas
Marinhos e Estuarinos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto
de Ciências do Mar – LABOMAR, Fortaleza, 2009.

1. Susceptibilidade 2. *Farfantepenaeus subtilis* 3. IMNV 4.
Desafio I. Gesteira, Tereza Cristina Vasconcelos (Orient.) II.
Universidade Federal do Ceará – curso de Mestrado em Ciências
Marinhas Tropicais III. Título.

CDD 639.543

"Quanto mais me elevo, menor eu pareço aos olhos de quem não sabe voar."

Nietzsche

A minha mãe pelo amor e apoio incondicional.

E ao meu avô Manoel que é meu tesouro.

Eu amo vocês!!

AGRADECIMENTOS

À Professora Tereza Cristina Vasconcelos Gesteira, minha mãe profissional, pela acolhida, incentivo, dedicação, orientação e conhecimentos repassados;

Aos funcionários e corpo docente do LABOMAR pela acolhida e ajuda recebida ao longo destes dois anos;

Ao Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos – CEDECAM pelas condições oferecidas para a realização da parte prática da pesquisa;

Aos grandes amigos Diego Felismino e Graça Coelho pela troca de idéias, cooperação na organização e revisão dos dados; A vocês minha profunda gratidão: Muito Obrigado!

Ao Rubens Galdino, Pedro Alexandre e João Mafaldo pela ajuda nas coletas, identificação dos animais;

Ao Professor Aduino pela contribuição no tratamento estatístico dos dados;

À Camila Cavalcante e Livia Raquel pela amizade e companheirismo antes e durante o período do experimento;

Ao Sr. Armênio pela pronta colaboração na coleta das amostras para o controle positivo;

Ao Buda pela confecção do mapa;

Às amigas Luiza Helena e Rosângela F. de Araújo pela amizade e incentivo;

A minha família, meus pais Luis Augusto e Alba Gomes, e irmãos Lauriana e Júnior, pelo apoio e incentivo;

A minha prima e irmã Hilcéia pela ajuda na correção ortográfica e por sempre estar presente em minha vida;

Em especial a Evandro Malanski um grande companheiro, pelas sugestões bem vindas e por ser um grande incentivador;

A todos os colegas do CEDECAM e GEMB, pelos momentos inesquecíveis que passamos nos últimos meses. Obrigada pela amizade, auxílio e, principalmente, pelas boas gargalhadas;

A todos aqueles que fazem o LABOMAR e que direta e indiretamente contribuíram na realização dessa pesquisa;

Principalmente a Deus, por permitir encontrar neste caminho tantas pessoas maravilhosas, cuja ajuda facilitou a conclusão deste trabalho.

RESUMO

As enfermidades virais são as que causam maiores prejuízos registrados na carcinicultura. O surgimento do IMNV no Nordeste do Brasil em 2002 colocou os produtores de camarão frente a uma enfermidade desconhecida que causou perdas significativas para o setor, tornando imperativo buscar um maior conhecimento sobre a doença e de como podem se comportar outras espécies de camarão ao vírus do IMN. O objetivo deste trabalho foi avaliar a susceptibilidade do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis*, nativo da costa brasileira, através de teste de desafio frente ao IMNV. Para realização do bioensaio foram utilizados 200 camarões jovens saudáveis mantidos em tanques individuais de 4L durante 30 dias. No experimento os camarões foram separados em dois grupos: controle e desafiado; o grupo desafiado foi alimentado com músculo de *L. vannamei* contaminado com IMNV e o controle alimentado com músculo de *L. vannamei* livre do vírus em estudo, durante 3 dias via “*per os*”. Após o desafio foram realizadas coletas aleatórias de 40 animais, 20 camarões controle e 20 camarões desafiados, a cada cinco dias (5º; 10º; 15º; 20º e 30º) onde durante cada coleta, foram extraídas hemolinfa para contagem total de hemócitos (CTH), brânquias para análise de RT/PCR e em seguida cada camarão foi fixado com solução de Davidson para análise histológica. As análises moleculares, utilizando a metodologia do Kit IQ2000, mostraram que dos 100 animais desafiados apenas dez (10 %) se mostraram positivos à infecção. Nas análises histológicas foi observado uma baixa infiltração hemocítica nos músculos; uma leve coagulação e presença de hemolinfa entre as fibras musculares caracterizando uma infecção leve. De acordo com o teste *t de Student* para dados independentes, houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre a contagem total de hemócitos do grupo desafiado e grupo controle na amostragem do 30º dia. O estudo demonstrou que a espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* é susceptível ao vírus IMN.

Palavras chaves: Susceptibilidade, *Farfantepenaeus subtilis*, IMNV, desafio.

ABSTRACT

Viral diseases are causing great damage in shrimp farming. With the IMN virus emergence in Northeastern Brazil in 2002, the shrimp producers faced an unknown disease that caused significant losses for the industry. Thus, a better knowledge about this disease and the investigation of how other species of shrimp are affected by the IMN virus will be an important contribution for the aquaculture industry. The objective of this study is to evaluate the susceptibility of *Farfantepenaeus subtilis* from the Brazilian coast, to the IMN virus. To conduct the bioassay it was used 200 healthy young shrimps kept in individual tanks of 4L for 30 days. The experimental design was composed by two separated groups: a control group and a challenged one which was exposed to the IMN virus. The challenged group was fed on *L. vannamei* muscle contaminated with IMNV and the control group was fed on muscle of *L. vannamei* free of the virus, for 3 days *per os*. After the challenge procedures, random samples of 40 animals, 20 control and 20 challenged were taken, every five days (5°, 10°, 15°, 20° and 30°). On each sampling hemolymph was drawn for the total count of hemocytes (THC), gills were taken for analysis by RT / PCR and then each animal was fixed with Davidson solution for histological analysis. The molecular analysis, using the methodology of Kit IQ2000, showed that among 100 animals challenged only ten (10%) were positive for infection. In histological analysis a low hemocyte infiltration was observed in muscles and a slight presence of hemolymph coagulation was detected between muscle fibers characterizing a mild infection. According to the Student t test for independent data, there was a statistically significant difference ($p \geq 0.05$) between the THC of challenged group and the control group sample of 30 days. The study showed wild specimens of *F. subtilis* to be susceptible to infection with IMNV.

Keywords: Suceptibility, *Farfantepenaeus subtilis*, IMNV, challenge.

FIGURAS

Figura 1	Eletromicrografia do vírus do IMN.	11
Figura 2	Camarão <i>L.vannamei</i> apresentando opacidade no segmento abdominal caracterizando a fase inicial do IMNV.	11
Figura 3	Tecido muscular com infiltração hemocítica e necrose de coagulação nas fibras musculares características da fase aguda do IMNV.	12
Figura 4	Tecido muscular da espécie <i>L. vannamei</i> com necroses de liquefação acompanhada de grande infiltração de hemócitos e fibrose (fase crônica).	12
Figura 5	Camarão <i>L. vannamei</i> com músculos e apêndices exibindo uma coloração avermelhada, caracterizando a fase crônica da enfermidade.	13
Figura 6	Esferóides ectópicos do órgão linfóide em camarão <i>L. vannamei</i> .	13
Figura 7	Localização geográfica do ponto de coleta dos camarões <i>F. subtilis</i> .	17
Figura 8	Ponto de coleta onde os camarões <i>F. subtilis</i> foram coletados no Estuário do Rio Pacoti.	18
Figura 9	Foto da espécie <i>Farfantepenaeus subtilis</i> .	19
Figura 10	Visão da sala de Bioensaio utilizada durante o desafio.	20
Figura 11	Extração da hemolinfa.	21
Figura 12	Extração das brânquias.	21
Figura 13	Aspectos histológicos de camarão <i>F. subtilis</i> apresentando músculo saudável.	26
Figura 14	Aspectos histológicos do camarão <i>F. subtilis</i> desafiado apresentando uma baixa infiltração hemocítica e uma leve coagulação.	26
Figura 15	Presença de hemolinfa entre as fibras musculares do camarão <i>F. subtilis</i> desafiado.	26
Figura 16	As trilhas 1, 2 representam detecção do IMNV no 5º dia após desafio. A banda 3 representa detecção no 10º dia pós desafio, as bandas 4 e 5 detecção do vírus no 15º dia após desafio, a banda 6 detecção do vírus no 20º e as bandas 7, 8, 9 e 10 reagentes no 30º dia de desafio. CN= Controle Negativo, CP= Controle Positivo e M = marcador de peso molecular: 848pb; 630pb e 333pb.	27

Figura 17 Valores da Contagem total de hemócitos dos camarões 28
desafiados via oral e do grupo controle em diferentes dias de
exposição do IMNV.

TABELAS

Tabela I	Classificação dos sinais clínicos da Mionecrose Infecciosa.	23
Tabela II	Número de camarões da espécie <i>F. subtilis</i> reagentes para IMNV.	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Susceptibilidade	04
2.2. O camarão rosa <i>Farfantepenaeus subtilis</i> .	05
2.3. O Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV).	07
2.4. Sistema Imunológico de Camarões.	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Coleta e Identificação da Espécie.	17
3.2. Obtenção do Músculo para Alimentação no Bioensaio.	19
3.3. Infecção Experimental.	19
3.4. Extração de RNA.	21
3.5. Detecção do IMNV por <i>Nested</i> RT_PCR.	22
3.6. Contagem Total de Hemócitos	22
3.7. Análises Histológicas	22
3.8. Análise Estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	30
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura quando bem planejada pode ser benéfica para o desenvolvimento econômico do setor e do país. É uma atividade complexa, que exige grande dedicação, constante aprendizado, contínua assistência técnica especializada, demanda de mercado e, acima de tudo, embasamento científico. O negligenciamento de algum desses pré-requisitos explica o fracasso de tantos empreendimentos (AGOSTINHO; GOMES; PELICICE; 2007). A aquicultura nacional pode ser uma importante ferramenta no estímulo ao aproveitamento de recursos locais, criando condições para a geração de emprego, renda e para a melhoria da qualidade de vida da população (VALENTI *et al*, 2000).

Conforme dados da FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations (2006), a produção mundial da aquicultura (marinha, estuarina e continental) cresceu 81,07% nos últimos 10 anos. No ano de 2006, a captura e aquicultura supriram o mundo com cerca de 110 milhões de toneladas de pescado, sendo 47,0% provenientes da aquicultura, que continua fortemente dominada pela região Ásia - Pacífico que contribui com 89% em termos de quantidade e 77% em termos de valor (FAO, 2008). Mais da metade de toda a produção global da carcinicultura é proveniente da China, que em 2008 produziu 1,4 milhões de toneladas de camarão em cativeiro; a Tailândia produziu 542 mil toneladas e exportou US\$ 2,2 bilhões. No Ocidente, o Equador com 600 km de litoral, já ocupa 200 mil hectares com fazendas de camarão, atingindo a marca de 123.361 toneladas produzidas (ROCHA, 2009).

O camarão é uma “commodity” de valor elevado e 17% do comércio internacional de produtos pesqueiros gerados, principalmente pela Ásia e América Latina, em especial para fins de exportação, traz um enriquecimento para muitos países em desenvolvimento nessas regiões (FAO, 2003).

A criação de camarão cresceu no Nordeste do Brasil, sobretudo no Estado do Ceará, em função da alta rentabilidade econômica, elevada produtividade e fácil adaptação da espécie *Litopenaeus vannamei*. A partir de meados da década de 90, a carcinicultura brasileira apresentou um crescimento considerável, tendo atingido uma produção 90.190 toneladas em 2003, chegando a alcançar a posição de líder no hemisfério ocidental, superando o Equador e o México que, tradicionalmente, ocupavam o primeiro e segundo lugares, respectivamente (ROCHA; RODRIGUES; AMORIM, 2004).

Em 2004, a carcinicultura registrou uma queda de 15,84% na produção e de 25,87% na produtividade média, em relação ao ano anterior, tendo como principais agentes

causadores a aplicação da sobretaxa *antidumping*, movida nos Estados Unidos pela Southern Shrimp Alliance de 7,05%, o que acarretou a diminuição das exportações, além de problemas cambiais e o surgimento da Mionecrose Infecciosa Viral – IMNV na Região Nordeste e o surto do Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) que praticamente extinguiu a atividade de carcinicultura no Estado de Santa Catarina (ABCC, 2004; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; RODRIGUES, 2005; SEIFFERT; WIINCKLER; MAGGIONI, 2005).

Em 2005, a produção sofreu uma nova depleção, atingindo o valor de 65.000 toneladas, estabilizando-se neste valor nos anos de 2006 e 2007 (ROCHA, 2008). A queda das exportações registrada no período de 2006 a 2007 foi de 66%, a maior retração da série histórica analisada pelo Centro Internacional de Negócios (CIN/CE), da Federação das Indústrias do Ceará (FIEC), e como resultado, o camarão passou da quarta para a oitava posição. Os mercados consumidores também foram declinando ao longo dos últimos anos, só entre 2006 e 2007, cinco países deixaram de consumir o produto local: Alemanha, Cabo Verde, Itália, Estados Unidos e Japão (BARREIRA, 2009).

A espécie *Litopenaeus vannamei* foi importada para o Brasil pela primeira vez em 1980 e passou a ser cultivada em larga escala em 1995 (BRIGGS *et al*, 2004). Esta espécie se destaca por apresentar uniforme taxa de crescimento, fácil adaptabilidade a diferentes condições do meio ambiente, fácil reprodução em laboratório e uma excelente aceitação no mercado (BRASIL, 2001). Contudo espécies exóticas podem introduzir novas enfermidades no ambiente. Algumas enfermidades de origens virais e bacteriológicas comuns ao *L. vannamei* têm sido responsáveis por graves problemas nos cultivos em todo o mundo, como WSSV, TSV (Vírus da Síndrome de Taura), IHHNV (Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética), IMNV (LIGHTNER, 2003); NHP (Hepatopancreatite Necrosante) (KROL; HAWKINS; OVERSTREET, 1991) e Vibrioses (VIEIRA *et al*, 2000; AGUIRRE-GUZMÁN; RUÍZ; ASCENCIO, 2004; CHIU *et al.*, 2007).

Ao longo da última década, têm sido registrados problemas consideráveis com enfermidades na aquicultura, principalmente devido a doenças virais (FAO, 2003), que ocorrem quando existe uma elevada carga viral no meio em contato com uma população suscetível e que se encontra sob estresse. O estresse tem sido citado com freqüência como fator predisponente, relacionado ao desequilíbrio do meio ambiente e uma maior vulnerabilidade dos espécimes, culminando em debilidade, manifestação de doenças e, conforme a severidade destas, chegando à morte (LIGHTNER, 1997).

Segundo Maia e Nunes (2003) a espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* possui uma boa adaptabilidade ao sistema de engorda intensiva, indicando seu potencial de cultivo em

larga escala, em densidades de estocagem semelhantes às praticadas para *L. vannamei*, sendo, portanto uma excelente opção para a carcinicultura brasileira.

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a susceptibilidade da espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis* ao Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV), por ser uma enfermidade de grande impacto para os cultivos no Brasil e considerando que os resultados obtidos poderão contribuir para a sustentabilidade do setor produtivo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Susceptibilidade

A susceptibilidade é a predisposição que os seres vivos apresentam aos vários tipos de patógenos existentes, tais como: vírus, bactérias; fungos, etc. A estrutura genética defeituosa também tornam os animais mais susceptíveis. Algumas infecções são menos agressivas e determinados agentes infecciosos são menos virulentos que outros (COWLEY *et al.* 2000).

Especialistas concordam que nem todos os seres são sensíveis a determinados patógenos, como por exemplo, o efeito de uma infecção viral que em algumas espécies de peneídeos pode ser mínimo ou até mesmo ausente, enquanto que para outras espécies apresenta manifestação severa (MARQUES; MOSER; MÜLER, 2006).

O vírus do IHHN que causa grave epizootia e mortalidade em massa na espécie *Penaeus stylirostris* (LIGHTNER, 1996a), em contrapartida se apresenta menos virulento para as espécies susceptíveis *P. monodon*, *L. vannamei* e *F. subtilis* causando baixa mortalidade (KALAGAYAN *et al.* 1991; CHAYABURAKUL, 2005; COELHO, 2006). Ressalte-se que a espécie *L. vannamei* se mostrou portadora assintomática do vírus IHHNV (LIGHTNER; REDMAN; BELL, 1983; BELL; LIGHTNER, 1984). Diferenças sutis na virulência de cepas isoladas do WSSV de diversas regiões geográficas sugeriram que a susceptibilidade ao agente patogênico pode variar de acordo com a espécie e o estágio de vida do hospedeiro (WANG *et al.*, 1999; WAIKHOM; 2006). Estudos têm demonstrado que o grau de severidade das infecções pode ser influenciado pelas variáveis ambientais. Carbajal-Sanchez, Castro-Longoria e Grijalva-Chon (2008) demonstraram que o vírus do WSS é significativamente mais severo para espécie *L. vannamei*, em salinidades de 15‰.

Testes de desafio usando o vírus da Taura (TSV) realizados por Overstreet *et al.* (1997) com as espécies *Farfantepenaeus duorarum*, *F. aztecus* e *Litopenaeus setiferus*, causaram elevada mortalidade a primeira espécie, mas a outras duas sobreviveram a infecção, sem apresentar os sinais clínicos característicos da enfermidade. A espécie exótica *Penaeus chinensis*, também investigada, mostrou ser altamente susceptível a este vírus, quando desafiada. Os autores sugeriram que *F. duorarum* e *F. aztecus* poderiam ser vetores ou hospedeiros assintomáticos do TSV.

Longyant *et al.* (2005) submeteram cinco espécies de palemonídeos (*Macrobrachium rosenbergii*, *M. lanchesteri*, *M. sintangense*, *Palaemon styliferus* e *P. serrifer*) a infecção artificial com injeção do vírus da cabeça amarela (YHV), sendo monitoradas através de análises moleculares e por imunohistoquímica. Três dias pós-infecção *M. sintangense*, *P. serrifer* e *P. styliferus* apresentaram sinais moderados da infecção, demonstrando serem susceptíveis à infecção, ao contrário de *M. rosenbergii* e *M. lanchesteri* que se mostraram resistentes.

2.2 O camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis*

Dentre as espécies de camarão que habitam a costa brasileira, as da família Penaeidae são as de maior importância econômica (PEREZ-FARFANTE, 1967). As espécies de camarão marinho *Farfantepenaeus subtilis* e *Farfantepenaeus brasilienses* apresentam potencial para o cultivo e provavelmente têm maior valor de mercado que o *Litopenaeus vannamei*, mas não foram devidamente estudados (NUNES; GESTEIRA; GODDARD, 1997).

O camarão *F. subtilis* descrito por Pérez-Farfante (1967), foi inicialmente identificada como a espécie *Penaeus subtilis*, todavia, com a nova revisão sistemática realizada por Perez-Farfante e Kensley (1997), a espécie passou a pertencer ao gênero *Farfantepenaeus*. Esta classificação foi ratificada por Maggioni *et al* (2001) que realizou um estudo filogenético molecular baseado em seqüências parciais do gene 16S mitocondrial.

De acordo com Pérez-Farfante e Kensley (1997), esta espécie tem a seguinte classificação taxonômica:

Filo- Arthropoda

Superclasse- Crustácea

Subclasse – Eumalacostraca

Superordem – Eucarida

Ordem – Decapoda

Subordem – Dendrobranchiata

Superfamília – Penaeoidea

Família – Penaeidae

Gênero – *Farfantepenaeus*

Espécie – *Farfantepenaeus subtilis*

O camarão *Farfantepenaeus subtilis* tem uma distribuição geográfica que vai desde o Mar do Caribe (Cuba e Pequenas Antilhas) até América do Sul e Central. No Brasil sua distribuição é observada desde a Região Norte até o litoral de Cabo Frio no Rio de Janeiro (PÉREZ-FARFANTE, 1969, 1988; HOLTHUIS, 1980; CERVIGÓN *et al.*, 1992; D'INCAO, 1995).

Esta espécie conhecida como camarão marrom, camarão rosa e camarão lixo habita ambientes de fundo lodoso, lamoso ou areno-lamoso, com profundidades de 1 até 190 m (PEREZ-FARFANTE, 1969; HOLTHUIS, 1980). Apresenta um comprimento total máximo chegando a 152 mm e 205 mm em machos e fêmeas, respectivamente (CERVIGÓN *et al.*, 1992). Possui carapaça lisa e sua coloração é geralmente marron podendo apresentar-se acinzentado ou amarelado. O rostro serrilhado é dotado de 8 ou 9 dentes na margem dorsal e 2 dentes na margem ventral, exibe cristas e sulcos adrostrais relativamente curtos estreitando-se à medida que se aproxima da extremidade distal do cefalotórax, não atingindo a borda posterior da carapaça (PEREZ-FARFANTE, 1967, 1969).

Esta espécie é essencialmente carnívora durante seu ciclo de vida, entretanto é classificado como onívoro oportunista, podendo consumir uma grande variedade de alimentos dentre eles: microalgas, detrito, poliquetas, anfípodos, foraminíferos, copépodos e outros microcrustáceos (NUNES, 1995).

A fêmea desta espécie apresenta téglico fechado, de aspecto liso, terminando na margem posterior do cefalotórax com o abdômen, observado a olho nu ou em microscópio estereoscópico, podendo ser pigmentada ou não, como ocorre no restante do corpo. Está situado na porção mediana do corpo na altura do 5º par de pereiópodos. Esta característica facilita sua reprodução em larviculturas e reduz os custos de produção de pós-larvas; pois, funciona na estocagem do espermátóforo transferido pelo macho durante o acasalamento, logo após a muda (PEREZ-FARFANTE, 1975; NUNES, 1995; SANTANA, 2005).

Durante o ciclo de vida desta espécie, as larvas são carregadas pelas correntes marítimas para o estuário onde alcançam o estágio de pós-larvas. Neste ambiente, encontram proteção e alimento, chegando assim à fase pré-adulta, quando migram para o oceano, onde ocorrerá à reprodução (ISAAC; DIAS NETO; DAMASCENO, 1992).

Na década de 70 e 80 o setor produtivo, na tentativa de viabilizar a carcinicultura no Brasil, tentou o cultivo de espécies nativas como exemplo o *F. subtilis* (BRASIL, 2001), pois a mesma possui uma larga tolerância às variações de salinidade, desenvolvimento rápido e disponibilidade de fêmeas maduras e de pós-larvas na natureza (MAIA, 1983). Apesar das tentativas feitas em cultivos durante esse período, a referida espécie não apresentou bons

níveis de produtividade devido a exigências nutricionais por rações com alto índice protéico (NUNES, 1995). A partir daí a solução para a validação da carcinicultura no Brasil foi à adoção da espécie exótica *L. vannamei* já cultivada com êxito no Panamá e Equador (BRASIL, 2001).

2.3 O Vírus da Mionecrose Infeciosa (IMNV)

A carcinicultura, como qualquer outro setor da aquicultura, está sujeita ao surgimento de doenças que podem causar um aumento no custo de produção e decréscimo na produtividade, prejudicando o ritmo do desenvolvimento desta atividade (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Por outro lado, o controle das enfermidades não se restringe somente ao patógeno, mas também ao manejo do cultivo onde os elos que compõem a cadeia produtiva estão diretamente interligados: o camarão, o ambiente de cultivo e os patógenos (HERNÁNDEZ; NUNES, 2001; MARTINS, 2006). Le Moullac e Haffner (2000) sugerem que a condição de estresse pode ocasionar a quebra da cadeia sendo um fator iniciante de doenças em cultivos.

Os causadores de enfermidades em camarão cultivado podem ser do tipo não-infeccioso ou infeccioso (BROCK, 1990; BROCK; MAIN 1994) O agente etiológico é definido como causador da doença e o contato com estes agentes resultará na redução efetiva da resistência imunológica dos animais, o que pode propiciar à ação de patógenos oportunistas e a incidência e/ou severidade de patologias nos peneídeos. As doenças de etiologia não infecciosa são ocasionadas por fatores ambientais, nutricionais, agentes tóxicos ou genéticos. Já as infecciosas são causadas por organismos patogênicos como: vírus, bactérias, fungos, protozoários e metazoários (VINATEA, 1996).

As doenças de etiologia viral constituem o principal problema enfrentado pelas fazendas de cultivo de camarões ao redor do mundo e alguns vírus provocam catastróficas perdas para a carcinicultura já que seu diagnóstico é mais difícil e não existem formas de tratamento após a infecção instalada (BACHÈRE; FUCHS; SÖDERHALL, 2000). Entre as enfermidades virais que acometem os camarões existem as de notificação obrigatória para o Escritório Internacional de Epizootias – OIE tais como: Vírus da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus*, WSSV), Vírus da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus*, TSV), Vírus da Cabeça Amarela (*Yellow Head Virus*, YHV), Vírus da Infecção Hipodermal e Necrose

Hematopoiética (*Infectious Hypodermal and Hematopietic Necrosis Virus*, IHHNV) (LIGHTNER, 1996b; HASSON; FAN; VARNER, 2005). Na atualização da OIE em janeiro de 2008 o Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV) foi incluído na lista de doenças de notificação obrigatória (OIE, 2009).

De acordo com Fegan e Clifford (2001) as enfermidades provocadas por vírus têm gerado importantes perdas na economia da maioria dos países. O surgimento de novos vírus e outros organismos patogênicos exigem um maior controle sanitário das doenças nas fazendas.

Existem patógenos que exibem um elevado grau de agressividade após a manifestação dos primeiros sinais de enfermidade como, por exemplo, o Vírus da Mancha Branca (WSSV) que é até o momento, a enfermidade mais devastadora para a carcinicultura, podendo causar 100% de mortalidade dentro de 3 a 10 dias do aparecimento dos primeiros sintomas da doença (LIGHTNER, 1996b; VASEEHARAN; JAYAKUMAR; RAMASAMY, 2003). O WSSV foi detectado pela primeira vez na província chinesa de Fujian, em 1992, de onde se espalhou rapidamente para a maioria dos países produtores de camarões (FLEGEL, 1997). Em 1999, as fronteiras brasileiras foram fechadas para a entrada de crustáceos, com a finalidade de impedir a introdução do WSSV no país. Apesar disso, em novembro de 2004, sinais clínicos da doença começaram a ser detectados em fazendas de camarões de Santa Catarina e em janeiro de 2005, foi diagnosticado nos municípios catarinenses de Imaruí e Laguna (SEIFFERT; WIINCKLER; MAGGIONI, 2005). O vírus da Síndrome de Taura (TSV) também provoca alta mortalidade chegando até 95% dos camarões cultivados, este foi descoberto em 1992 em fazendas do Equador e depois se espalhou para outros países das Américas (LIGHTNER, 2005).

A Mionecrose Infecciosa Viral (IMNV) causou um grande impacto na carcinicultura Brasileira em 2003, gerando perdas econômicas de aproximadamente 20 milhões de dólares para o setor. A elevada mortalidade frequentemente se dá na fase de alto consumo de ração tendo um forte impacto sobre o fator de conversão alimentar (FCA) e a produtividade anual do empreendimento, por isso os prejuízos econômicos são significativos devido à perda de biomassa na fase avançada do cultivo (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

O IMNV foi relatado pela primeira vez no nordeste do Brasil em uma fazenda de cultivo de camarão *Litopenaeus vannamei* no Estado do Piauí, em 2002 e inicialmente foi denominada Necrose Idiopática Muscular (NIM). Camarões a partir de 7g apresentavam perda da transparência no músculo abdominal e elevada mortalidade diária. Os sintomas da doença chegaram ao litoral oeste do Ceará, mais especificamente, nos municípios de Chaval, Camocim e Acaraú e logo se disseminaram para o litoral leste do Estado. A sintomatologia do

vírus foi relatada pouco tempo depois nos Estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco que segundo Gesteira (2006) se deu devido à ausência de barreiras sanitárias da atividade no Brasil.

Em 2003, alterações ambientais foram ocasionadas por um quadro chuvoso acima da média no litoral da Região Nordeste onde foi possível observar além de uma grande amplitude térmica diária, uma queda brusca na salinidade (50 a 10 ppt), excesso de partículas em suspensão e uma floração atípica de fitoplâncton. Embora o *L. vannamei* seja uma espécie resistente as mudanças nos parâmetros físico-químicos, a presença de contaminantes ambientais tóxicos resultantes da floração de cianobactérias pode ter afetado o sistema imune dos camarões, tornando-os susceptíveis a enfermidades. (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Na tentativa de identificar uma possível causa da doença, realizou-se uma comparação de alguns parâmetros em comum (tipo da água do cultivo, fontes de ração, pós-larvas e densidade de estocagem do camarão) entre as fazendas afetadas dos estados do Piauí e Ceará, não tendo sido encontrada nenhuma relação entre estes (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; PEREIRA; MENDES; GESTEIRA, 2008).

A princípio o quadro clínico observado foi associado à Doença do Algodão que é causada por microsporídios, parasitas intracelulares. Esta hipótese foi logo descartada pelos pesquisadores da Universidade do Arizona (UAZ) que também realizaram análises moleculares (PCR) para os vírus da Mancha Branca (WSSV), Cabeça Amarela (YHV), Síndrome de Taura (TSV), Infecção Hipodermal e Necrose Hematopoiética (IHHNV) e para o Parvovírus Hepatopancreático (HPV), obtendo resultado positivo somente para o IHHNV, o qual segundo Lightner *et al* (1983) causou uma mortalidade superior a 90% na espécie *L. stylirostris* em fazendas de cultivo no Hawaii em 1981, já nas espécies *P. monodon* e *L. vannamei* é menos virulento (BELL; LIGHTNER, 1984). Dúvidas surgiram, uma vez que a sintomatologia do IHHNV não tinha nenhuma associação com aquelas observadas nos camarões cultivados no nordeste brasileiro.

Subseqüentes análises histopatológicas realizadas na UAZ apontaram para a Síndrome do Músculo Grampado (Cramped Muscle Syndrome – CMS) que apresenta sintomas de necrose muscular do abdômen e cefalotórax e sua ocorrência está relacionada a fatores ambientais ou nutricionais, como a deficiência de vitamina B e desequilíbrio na relação Ca: Mg da água (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004)

No final de 2003, amostras de água das regiões afetadas foram encaminhadas ao Laboratório da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) para análise, sendo verificados

um excesso de partículas em suspensão e uma floração atípica da comunidade fitoplanctônica com alta concentração de Triconas de Cianobactérias filamentosas pertencentes aos gêneros *Pseudanabaena* e *Limnothrix*, variando de 150.000 a 280.000 cel/mL onde os níveis aceitáveis no cultivo de camarão é no máximo 40.000 cel/mL. A floração de cianobactérias gerou uma constante mortalidade em viveiros de *P. monodon* na Austrália (SMITH, 1996). Os sintomas que os animais apresentavam eram: letargia, queda no consumo alimentar, cauda esbranquiçada, hepatopâncreas pequeno e pálido, crescimento reduzido e dificuldade de muda (PÉREZ-LINARES *et al.*, 2003). Baseado nestes relatos levantou-se a hipótese de que as condições observadas nas fazendas do Brasil eram condizentes com os sintomas da Enterite Hemocítica, enfermidade esta ocasionada por floração de algas filamentosas.

Em maio de 2003, cortes histológicos da cauda de camarões moribundos foram analisados pelo Centro de Diagnóstico de Enfermidades de Organismos Aquáticos (CEDECAM / LABOMAR/UFC) que detectou a presença de esferóides ectópicos do órgão linfóides (EOL) estruturas características de infecções virais ou bacterianas. Em junho de 2003, o laboratório do UAZ ratificou a presença de EOL e com o objetivo de conhecer o agente causador da doença, realizou um bioensaio de infectividade com amostras oriundas do NE brasileiro. A análise histopatológica do material do experimento confirmou a transmissão horizontal da patologia e levantou a suspeição de que a doença poderia ser causada por um agente viral (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Ainda em 2003, Graf *et al* realizaram em laboratório, um bioensaio que demonstrou que o maior índice de transmissão do IMNV ocorria realmente pela ingestão direta de tecidos contaminados, ratificando o que foi observado pelos pesquisadores da UAZ.

Em fevereiro de 2004, foi diagnosticado através de microscopia eletrônica e análise genômica a origem viral da patologia e a partir daí a doença recebeu o nome de Mionecrose Infeciosa Viral– IMNV (LIGHTNER *et al*, 2004a).

Análises filogenéticas realizadas mostraram similaridades significativas entre a Polimerase RNA-dependente (RdRp) do IMNV com um vírus (*Giardia lamblia* vírus - GLV) pertencente a família *Totiviridae*, indicando que o IMNV pode ser o único membro desta família capaz de infectar invertebrados (POULOS *et al.*, 2006).

O vírus IMN possui simetria icosaédrica, 40 nm de diâmetro e tem densidade de 1,366 g/mL em CsCl (Figura 1). É composto de uma única molécula de dsRNA com 7.560 pb. Possui dois ORF's (*open reading frame*), onde a ORF extremidade 5' (ORF 1, nt 136-4953) codifica as proteínas do capsídio e a RNA- binding, enquanto que o ORF da

extremidade 3' (ORF 2, nt 5241-7451) apresenta genes para a codificação da RNA polimerase RNA-dependente (RdRp) (LIGHTNER *et al*, 2004; POULOS *et al*, 2006).

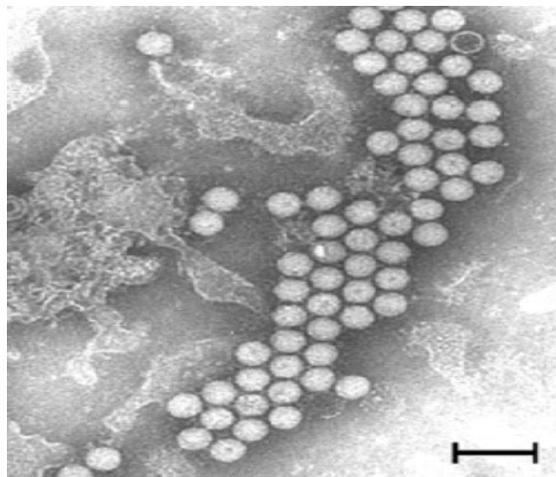


Figura 1 – Eletromicrografia do vírus IMN, 100nm
Fonte: (POULOS *et al*, 2006).

O IMNV se caracteriza por causar necrose nos músculos estriados do abdômen, a qual se manifesta através da perda da transparência da cauda, que se torna opaca, podendo iniciar no quinto ou sexto segmento abdominal, ou nas áreas laterais e distais da cauda, próximo aos pleópodos - Figura 2.



Figura 2 - Camarão *L. vannamei* apresentando opacidade no segmento abdominal caracterizando a fase inicial do IMNV. Fonte: Diego Apolinário (CEDECAM/LABOMAR).

Na fase aguda o IMNV apresenta necrose de coagulação com alguns edemas entre as fibras musculares (Figura 3). Já na fase crônica da doença apresenta necrose de coagulação e

liquefação (Figura 4), neste estágio os músculos e os apêndices afetados exibem uma coloração avermelhada – (Figura 5) (LIGHTNER *et al* 2004a; 2004b; NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

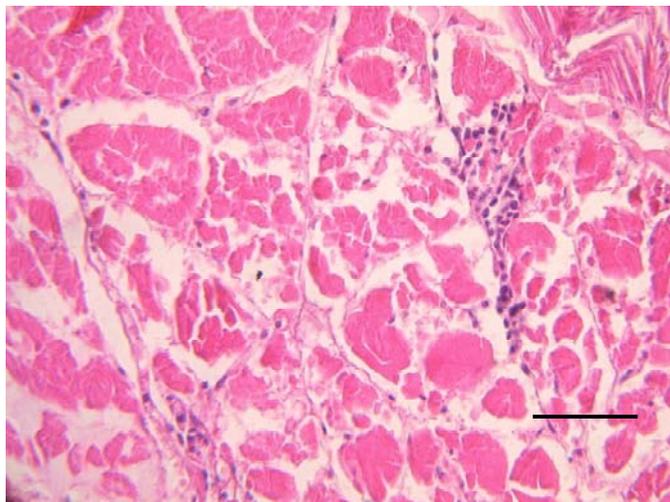


Figura 3 - Tecido muscular com infiltração hemocítica e necrose de coagulação nas fibras musculares características da fase aguda do IMNV. H&E. Fonte: Feijó R.G. (CEDECAM/LABOMAR). Escala 50µm.

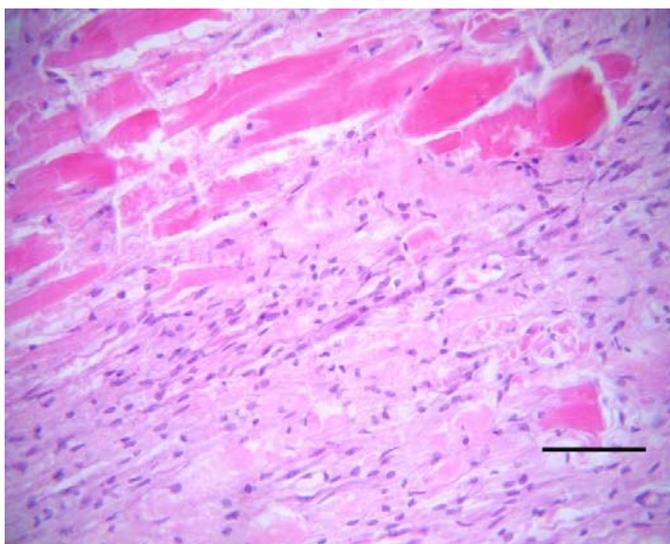


Figura 4 - Tecido muscular da espécie *L. vannamei* com necroses de liquefação acompanhada de grande infiltração de hemócitos e fibrose (fase crônica). H&E. Fonte: Feijó R. G. (CEDECAM/LABOMAR). Escala 50µm.



Figura 5 - Camarão *L. vannamei* com músculos e apêndices exibindo uma coloração avermelhada, caracterizando a fase crônica da enfermidade.

Fonte: Pereira, A (EMBRAPA-PI).

A progressão da mionecrose infecciosa é acompanhada de infiltração hemocítica, fibroses, formação de esferióides do órgão linfóide (EOL), especialmente no coração e próximo aos túbulos da glândula antenal (ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008; PEREIRA, MENDES; GESTEIRA, 2008; LIGHTNER *et al* 2004) – Figuras 6.

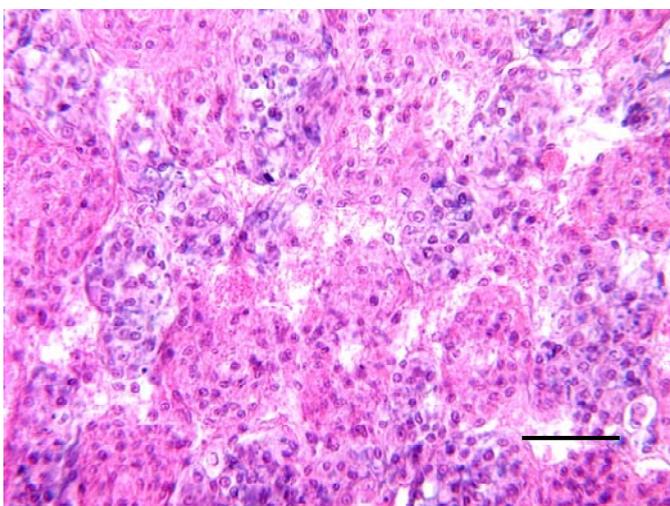


Figura 6 - Esferóides ectópicos do órgão linfóide em camarão *L. vannamei*. H&E. Fonte: Rubens Galdino. (CEDECAM/LABOMAR). Escala 50µm.

Os camarões podem exibir redução ou suspensão no consumo alimentar, perda do volume do hepatopâncreas, ausência ou redução de lipídeos, dificuldade no endurecimento do exoesqueleto e natação errática. Os indivíduos enfermos apresentam-se debilitados e grammando facilmente em sua captura e manuseio (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Até o momento pouco se sabe sobre a distribuição geográfica do IMNV. No início de 2006, foi relatada uma grande mortalidade no cultivo do camarão *L. vannamei* na Indonésia, onde os indivíduos apresentavam sintomatologia similar à relatada no Brasil, tendo sido levantada a hipótese da entrada de reprodutores sem fiscalização e transferência de estoques cultivados (SENAPIN *et al.*, 2007). Posteriormente, também foi registrado em Hainan na China (ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008).

Os métodos de diagnósticos utilizados para a detecção do IMNV são: Hibridização “*In Situ*”, Transcrição reversa do RNA total seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), PCR em Tempo Real, Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) e Histopatologia (TANG *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2007; ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008; PUTHAWIBOOL *et al.*, 2009; PINHEIRO *et al.*, 2007)

2.4 Sistema Imunológico do Camarão

Há um grande interesse no conhecimento dos mecanismos de defesa do sistema imune dos crustáceos, com o intuito de reduzir o efeito do patógeno no hospedeiro, aumentando o controle e a prevenção de doenças (LIGHTNER, 1992).

O sistema imunológico tem como função primordial destruir os agentes patogênicos invasores.

Os invertebrados são dotados somente de um sistema de defesa primitivo denominado de sistema imune inato ou natural. Já os vertebrados além do sistema inato possuem um sistema imune adaptativo ou adquirido que é mais recente, altamente complexo e eficiente, dispondo de uma linhagem de células linfocíticas de extrema importância para os mecanismos de especificidade e memória imunológica. A ausência de células linfocíticas nos invertebrados inviabiliza qualquer tentativa de desenvolvimento de vacinas, diminuindo assim de forma substancial, a possibilidade de se prevenir e controlar infecções em crustáceos (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

O sistema imune dos crustáceos é constituído principalmente pela hemolinfa, isso se deve ao fato dela ser altamente fluida e também por ser capaz de atingir diretamente todos os tecidos dos crustáceos. É composta por células circulantes ou hemócitos, proteínas plasmáticas e reações integradas em sistemas multiméricos que englobam ambos os tipos de componentes, celulares e humorais. Portanto, o mecanismo de coagulação da hemolinfa é essencial para a resposta imune dos camarões, pois é um dos fatores essenciais que irá sugerir a possibilidade da presença ou não de patógenos (IWANAGA; LEE, 2005);

O tecido hematopoiético produz e libera na circulação os hemócitos dos crustáceos, apresenta uma alta proliferação celular sendo ainda responsável pela diferenciação e a maturação dos hemócitos que serão liberados na hemolinfa (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002a). Existe uma falta de uniformidade na identificação dos hemócitos principalmente pelo fato dessas células serem muito lábeis e reativas, alterando rapidamente suas características morfofisiológicas *in vitro*, tornando seu estudo ainda mais difícil do que os dos leucócitos dos vertebrados. A ativação dos hemócitos dos crustáceos resulta geralmente em seu espraiamento e degranulação, havendo a liberação de uma grande variedade de efetores imunológicos para o plasma. Nos últimos anos houve um grande progresso no estudo destas células, devido ao desenvolvimento de várias soluções anticoagulantes específicas, além de meios capazes de estabilizar adequadamente os hemócitos *in vitro* (BACHÈRE, 2000).

A Contagem Total de Hemócitos (CTH) flutuantes varia em resposta ao estresse ambiental, atividade endócrina, durante o ciclo de muda e infecção (JOHANSSON, 2000; JIRAVANICHPAISAL; LEE; SODRHALL, 2006). Um forte declínio no número de hemócitos circulantes foi observado em camarões *L. vannamei* infectados com os vírus WSS e IHVN (YEH *et al.*, 2009); também foi relatada uma diminuição na CTH após outras infecções virais (HENNIG *et al.*, 1998). A diminuição da circulação dos hemócitos nos camarões infectados poderá ser resultado da sua migração para os tecidos, onde muitas partículas virais estão presentes (VAN DE BRAAK *et al.*, 2002a).

São descritos atualmente três tipos de hemócitos para os crustáceos: hemócitos hialinos (HH), hemócitos semi-granulares ou com grânulos pequenos (HGP) e hemócitos granulares ou com grânulos grandes (HGG) (MAGGIONI, 2002; LE MOULLAC; HAFFNER, 2000; SRITUNYALUCKSANA; SÖDERHÄLL, 2000). De maneira geral, os HH dos crustáceos são usualmente descritos como os menores hemócitos, com uma alta relação núcleo-citoplasma contendo nenhum a poucos grânulos. Já os hemócitos granulares (HGP e HGG) são descritos como células de citoplasma mais abundante e muito rico em grânulos de diversos tamanhos e conteúdos. Os HGP seriam formas intermediárias que

amadureceriam e transformar-se-iam em HGG. De acordo com alguns autores, os HH pertenceriam a uma linhagem celular distinta dos hemócitos granulares e estariam essencialmente relacionados aos mecanismos de coagulação. Já os hemócitos granulares estariam principalmente envolvidos na fagocitose de microrganismos, na formação de nódulos e cápsulas e na produção de moléculas tóxicas e microbicidas capazes de lisar e/ou degradar os patógenos invasores. (BARRACO; PERAZZOLO; ROSA, 2008).

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

A fagocitose é a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos. Um processo onde o agente estranho é englobado, interiorizado e destruído intracelularmente pelos hemócitos através de mecanismos degradativos e microbicidas. Em crustáceos existem controvérsias sobre quais tipos de hemócitos participam do processo fagocítico (BARRACCO, 2004).

Quando a cavidade corpórea do crustáceo é invadida por uma quantidade maciça de microrganismos, desencadeia-se o processo de formação de nódulos. Esta reação se caracteriza basicamente por uma agregação dos microrganismos junto ao local da infecção e seu aprisionamento dentro de várias camadas de hemócitos, com a finalidade de impedir sua disseminação dentro da cavidade corpórea. Nas regiões mais centrais dos nódulos, observam-se geralmente sinais de fagocitose e de necrose celular (BAUCHAU, 1981; SÖDERHÄLL; CERENIUS, 1992).

O sistema de defesa melhor conhecido em crustáceos é o sistema profenoloxidase ou sistema proPO. É um sistema ativado durante as reações imuno- celulares, como a formação de nódulos e cápsulas hemocíticas que são frequentemente acompanhadas por uma reação de melanização na região próxima aos patógenos aprisionados. A enzima que produz a melanina é a fenoloxidase (PO) que se encontra sob a forma inativa ou pró-fenoloxidase (proPO) nos grânulos dos hemócitos dos crustáceos. Durante a cicatrização de ferimentos ocorre a coagulação da hemolinfa e a migração dos hemócitos ao local permitindo a formação de um tampão celular até que uma nova cutícula seja reconstituída (LE MOULLAC *et al*, 1998).

Portanto, o conhecimento do sistema imunológico dos crustáceos pode ser um importante subsídio para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico de diferentes patologias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e Identificação da Espécie

Os camarões foram coletados durante a maré baixa por rede de arrasto no Estuário do Rio Pacoti (Figuras 7 e 8) um dos mais importantes recursos hídricos do Ceará, localizado na costa leste do Estado sendo um dos maiores cursos d'água que atravessa a Região Metropolitana de Fortaleza – RMF (QUEIROZ, 2005).

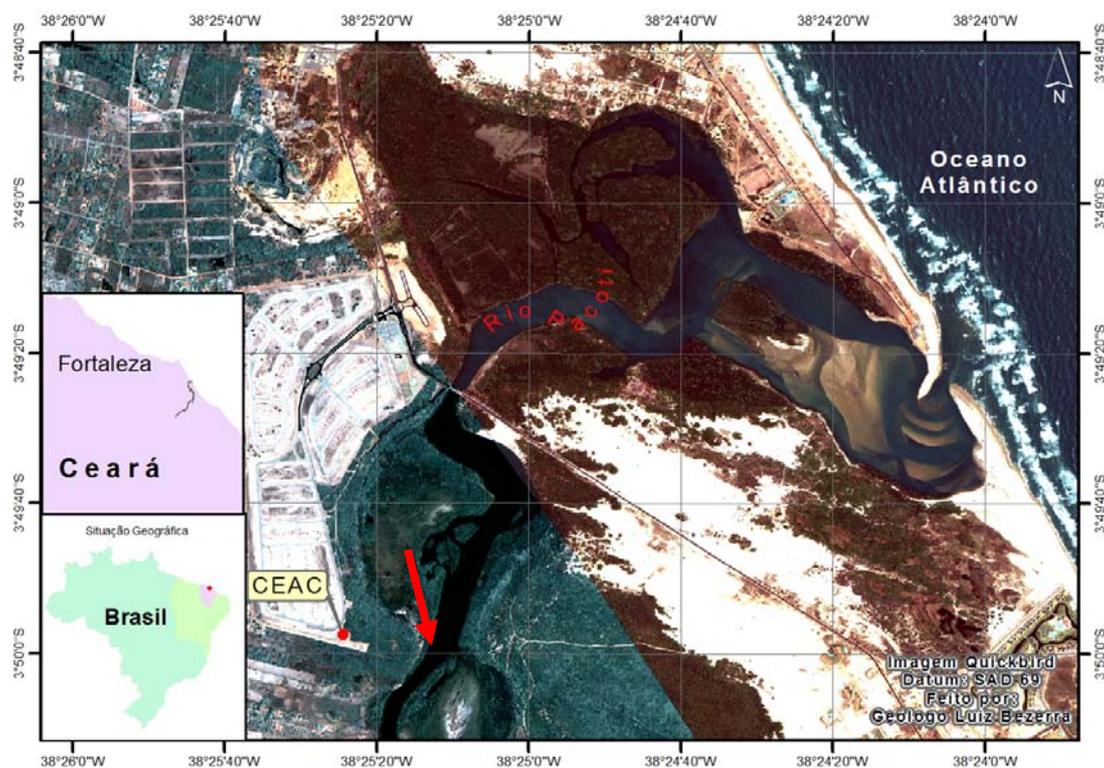


Figura 7 – Localização geográfica do ponto de coleta dos camarões *F. subtilis*.



Figura 8 – Ponto de coleta dos camarões *F. subtilis* no Estuário do Rio Pacoti.

Em seguida, os animais foram colocados em bambonas de 50L contendo água do local de coleta com oxigenação constante e transportados até o Instituto de Ciência do Mar. Em laboratório, os indivíduos foram estocados em 4 tanques de fibra de vidro de 500L, contendo água do mar previamente clorada, com oxigênio dissolvido 6.0 ± 1.0 mg/L, salinidade 30 ± 2 ups (unidades práticas de salinidade), pH 8.0 ± 0.4 e temperatura $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Durante a semana de aclimação os camarões foram alimentados com ração peletizada duas vezes ao dia. Em seguida foram triados por espécie e tamanho, somente selecionando camarões da espécie *Farfantepenaeus subtilis* com peso de 1,0 a 3,0 g, onde foram diferenciados utilizando estereoscópio Leica 2000 segundo a metodologia proposta por Pérez-Farfante e Kensley (1997), tomando como base a cor, exoesqueleto contendo cromatóforos em toda sua extensão, rostro apresentando espinhos dorsais e ventrais, sulcos adrostrais largos na parte mediana da carapaça estreitando-se à medida que se aproxima da margem posterior (Figura 9).



Figura 9: Foto da espécie *Farfantepenaeus subtilis*.

3.2 Obtenção do Músculo para Alimentação no Bioensaio.

As amostras de camarão *L. vannamei* contaminados pelo vírus IMN usadas no desafio foram provenientes de uma fazenda de carcinicultura. Os animais apresentavam características compatíveis com a sintomatologia do IMNV e após a análise utilizando a técnica de PCR mostram-se positivos ao vírus investigando. As amostras de músculo de *L. vannamei* não reagentes ao IMNV após teste de RT-PCR foram adquiridas em outra fazenda do litoral noroeste do Estado do Ceará.

3.3 Infecção Experimental

Após a identificação, 200 camarões foram colocados individualmente em tanques de plástico retangulares contendo 4L de água do mar previamente clorada, filtrada com salinidade de 30 ups, pH 7.8 ± 0.5 , temperatura 27.0 ± 2.0 °C, oxigênio dissolvido 6.0 ± 0.2 mg/L, sistema de filtragem e aeração constante (Figura 10).



Figura 10 – Visão da sala de Bioensaio utilizada durante o desafio.

Os tanques foram arranjados em seis estantes de plástico e divididos em dois grupos: 100 animais para o desafio viral e 100 para o grupo controle. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Antes da exposição ao vírus, amostras de brânquias de cada camarão foram coletadas para análise de detecção por RT/PCR utilizando metodologia do Kit IQ2000 para certificação de que os animais estavam livres do vírus IMNV. O experimento teve duração de 30 dias. A exposição ao vírus, durante três dias, foi feita através da oferta “*per os*” de músculo de *L. vannamei* contaminado com IMNV, uma vez ao dia, na proporção de 3,5% do peso corporal de cada indivíduo, em substituição aos arraçoamentos para assegurar o consumo de todo alimento ofertado. O grupo controle foi alimentado na mesma proporção com músculo de camarão *L. vannamei* livre do vírus IMNV. Após o período de desafio, todos os camarões foram alimentados duas vezes ao dia, com a mesma ração comercial inicialmente usada. Diariamente, os animais foram cuidadosamente monitorados para registro de ocorrência de muda, mortalidade, alterações macroscópicas como a opacidade da musculatura abdominal característica da infecção por IMNV. Além disto, foram aferidos salinidade, temperatura e oxigênio de cada tanque. No decorrer de 30 dias foram realizadas coletas aleatórias de 40 animais, 20 camarões do controle e 20 camarões dos desafiados, a cada cinco dias (5°; 10°; 15°; 20° e 30°). Durante cada coleta, foram extraídas hemolinfa para contagem total de hemócitos (Figura 11) e brânquias para análise de RT/PCR (Figura 12). A seguir, cada camarão foi fixado com solução de Davidson, colocado separadamente em recipientes de plástico, devidamente etiquetados e contendo o mesmo

fixador para posterior processamento histológico, segundo metodologia descrita por Lightner (1996b). Os animais que morreram nos intervalos das coletas, tiveram apenas as brânquias coletadas para análise de RT/ PCR.



Figura 11 - Extração da hemolinfa.

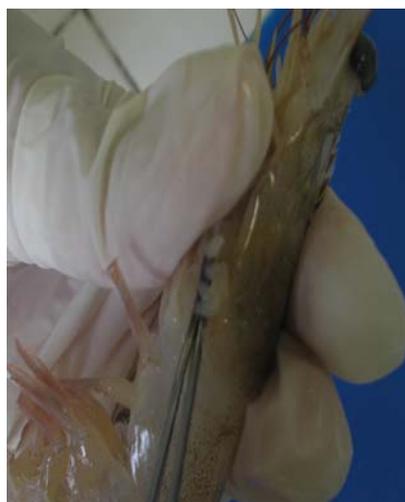


Figura 12 - Extração das brânquias.

3.4 Extração de RNA

O RNA total para a detecção do IMNV foi extraído com a utilização do kit IQ2000 (Faming intelligene Tech Corp.), de acordo com protocolo recomendado pelo fabricante. O RNA extraído foi quantificado utilizando-se absorvância na faixa de 260nm e o grau de pureza do RNA total também foi verificado observando a relação entre as medidas de absorvância (260A/280A).

3.5 Detecção do IMNV por *Nested* RT-PCR

A RT-PCR para detecção do IMNV nas amostras foi conduzida de acordo com as instruções do Kit IQ 2000 IMNV Detections and Prevention System (Farming IntelliGene Tech. Corp., Taiwan). 10 µL dos produtos de PCR/RT-PCR e seus controles positivos e negativos foram aplicados em gel de agarose 2%, contendo o tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e corado com brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada em cuba (*Electrophoresis Systems FB-SB-1316 FisherBiotech*[®]) por 60min/ 60 W de corrente contínua. A visualização do gel foi feita em transluminador ultravioleta *UV Transluminator SPECTROLINE*[®] e foto documentado por uma câmera *Kodak* através do software *EDAS 290*.

3.6 Contagem Total de Hemócitos

Nas cinco amostragens, a coleta da hemolinfa foi realizada com o auxílio de seringas de 1mL contendo solução tamponada Tris-HCL 1M (Tris-HCl 0,01M; Sacarose 0,25M; Citrato de Sódio 0,1M; pH 7,6 e formalina a 5%), usada como anticoagulante na proporção de 1:3. A hemolinfa foi retirada da região ventral do hemocelo no início do primeiro segmento abdominal sendo transferida para microtubos e mantida sob refrigeração. O procedimento para a Contagem Total de Hemócitos (CTH) de todos os camarões foi realizada utilizando câmara de Neubauer e analisadas em microscópio de luz (HENNING *et al.*, 1998). A CTH é um procedimento utilizado como um indicador para avaliar a estado de saúde dos camarões.

3.7 Análises Histológicas

Os camarões fixados com solução de Davidson (Bell; Lightner, 1988), por ocasião das coletas, foram lavados em água corrente, após 24 horas e em seguida seccionados em três partes: cefalotórax (corte longitudinal), terceiro e sexto segmentos abdominais, sendo os fragmentos colocados em histocassetes submersos em álcool 70%. Posteriormente passaram

pelos processos histológicos de rotina compreendendo: desidratação em uma série gradativa de álcool, diafanização em xilol, impregnação em parafina em estufa a 60°C e emblocamento. Cortes de 4µm foram obtidos com o auxílio de um micrótomo LEICA e em seguida corados pelo método de Hematoxilina e Eosina (JUNQUEIRA e JUNQUEIRA, 1983). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz de acordo com classificação descrita por Pereira, Mendes e Gesteira (2008) que se baseiam nos sinais clínicos da infecção (Tabela I); e fotodocumentadas por uma câmera Canon através do software (ZoomBrowser EX®CANON).

Tabela I – Classificação dos sinais clínicos da Mionecrose Infecçiosa.

CLASSIFICAÇÃO	SINAIS CLÍNICOS
Leve	Pequenos focos de opacidade muscular nos últimos segmentos abdominais e uma leve infiltração de hemócitos.
Aguda	Necrose muscular de coagulação nas fibras musculares com presença de edemas. Observação de esferóides ectópicos do órgão linfóide -EOL.
Crônica	Necroses de liquefação acompanhadas de grandes infiltrações de hemócitos e fibrose. Presença de esferóides do órgão Linfóide – LOS.

3.8. Análise Estatística

Para análise estatística da CTH foi aplicado o teste *t de Student* que é o mais usado na comparação de duas amostras independentes para inferir se existe diferença entre as populações amostrais. Foi feita uma comparação entre a CTH de todos os camarões amostrados tanto do grupo controle como do grupo desafiado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos dos tanques foram devidamente monitorados, mantendo-se uma salinidade de 30 ups, pH 7.8 ± 0.5 , temperatura 27.0 ± 2.0 °C, oxigênio dissolvido 6.4 ± 0.2 mg/L, garantindo uma situação de conforto para os organismos confinados. De acordo com Vinatea (2004) se o ambiente estiver sendo deteriorado e o cultivo não for bem manejado, o sistema torna-se desconfortável, aumentando gradativamente o nível de estresse dos organismos e, conseqüentemente, diminuindo a produção.

A baixa qualidade da água e do solo nos viveiros pode estressar os peixes e camarões, causando perda de apetite, crescimento lento, maior susceptibilidade a doenças, parasitoses e conseqüentemente, aumentando a mortalidade (BOYD, 1997).

Nos últimos anos o interesse científico sobre a investigação e a identificação do comportamento das espécies aquáticas frente a agentes infecciosos, tem aumentado. Uma doença pode ser considerada como resultado final de uma interação complexa do animal ou hospedeiro com o seu ambiente e o patógeno propriamente dito (SNIESZKO, 1973).

O desafio de susceptibilidade em camarões juvenis da espécie nativa *F. subtilis* ao vírus IMN via “*per os*” durante 30 dias resultou em uma baixa mortalidade, sugerindo que esse vírus não causa infecção letal à espécie investigada (Tabela II).

Graf *et al* (2003) submeteram a espécie *L. vannamei* a um bioensaio no qual testaram a transmissibilidade do vírus IMN, utilizando os seguintes métodos de infecção: ingestão de tecido contaminado via “*per os*”; através de água inoculada com extrato contaminado; através da ingestão de fezes de aves alimentados com camarões contaminados; transmissão horizontal através de efluentes de populações de camarões contaminados e infecção através da ingestão de biomassa de artêmia adulta viva e alimentada com emulsão de camarões contaminados. Ao final foi constatado que a maior transmissibilidade ocorreu via “*per os*” causando uma mortalidade de 34,7% sendo muito superior a segunda maior mortalidade (18,7%) de indivíduos acondicionados em tanques contendo água inoculada com extrato contaminado.

Sinais clínicos da infecção pelo IMNV, como perda da transparência do músculo dos últimos segmentos abdominais, que posteriormente podem apresentar uma coloração avermelhada como descrito por Nunes, Martins e Gesteira (2004) não foram detectados na espécie desafiada. Poulos *et al* (2006) realizaram estudos com camarões SPF da espécie *L. vannamei* injetando partículas virais de extrato purificado do IMN, tendo verificado sinais clínicos como opacidade no músculo esquelético, cinco dias após a infecção. Provavelmente,

a diferença entre os dois resultados deve-se em parte a diferença das cargas virais empregadas nos dois testes e a resposta de cada espécie a exposição a um determinado agente etiológico.

Tabela II - Número de camarões da espécie *F. subtilis* reagentes para IMNV.

Período amostral	Nº Ind.	Mortalidade	Quantidade de animais amostrados*	+IMNV (mortos/amostrados)
0 dia	100	-	-	0 (- / -)
5º dia	80	2	18	2 (1 / 1)
10º dia	60	2	18	1 (1 / 0)
15º dia	40	0	20	2 (0 / 2)
20º dia	20	1	19	1 (0 / 1)
30º dia	0	0	20	4 (0 / 4)
	Total	5	95	10 (2 / 8)

* Foram coletados 20 camarões por amostragem incluindo os que morreram durante o período experimental.

+ IMNV: Reagentes pela técnica de PCR.

Os achados histológicos na espécie nativa *F. subtilis* desafiados com o IMNV mostraram que em 10% dos indivíduos foi observada baixa infiltração hemocítica nos músculos do cefalotórax, pleópodos e abdômen dos camarões 1; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 e uma leve coagulação e presença de hemolinfa entre as fibras musculares dos camarões 8; 9; 10, caracterizando uma infecção leve. Comparando com o tecido muscular normal que apresenta feixes de fibras com células longas, cilíndricas e multinucleadas podemos observar a destruição das fibras musculares dos camarões 05 e 08. (Figura 12, 13 e 14). Em um ensaio com o *L. vannamei* utilizando as técnicas de histopatologia e ISH Andrade *et al* 2007 observaram severos danos causados pelo IMNV nos músculos estriados do cefalotórax, pleópodos, pereópodos e abdômen, após 44 dias.

Não foi evidenciada a presença de necrose muscular de coagulação ou necrose de liquefação com grande infiltração de hemócitos, nem a presença de esferóides do órgão linfóide bem como o LOS ectópico que geralmente ocorrem em camarões que se encontram em estágios mais avançados do vírus IMN (TANG *et al*, 2005; LIGHTNER *et al*, 2004b; MARTINS; GESTEIRA; VIEIRA, 2004).

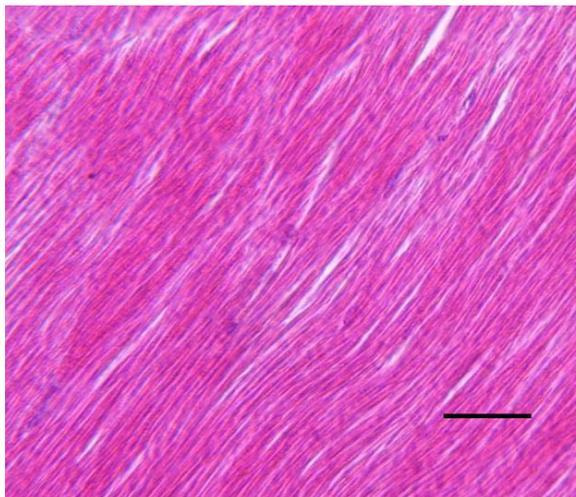


Figura 13 - Aspectos histológicos de camarão *F. subtilis* apresentando músculo saudável. Escala 50 μ m.

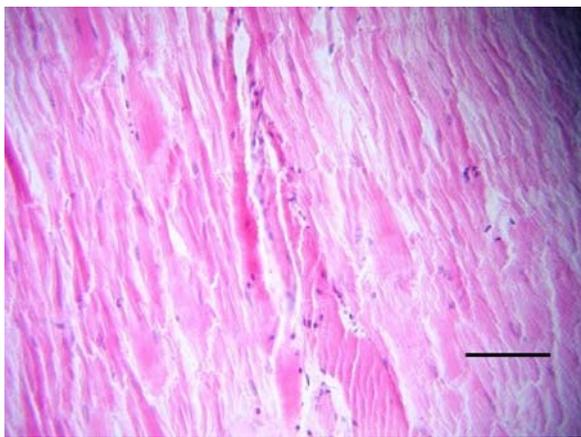


Figura 14 - Aspectos histológicos do camarão 05 *F. subtilis* desafiado apresentando uma baixa infiltração hemocítica e uma leve coagulação. Escala 50 μ m

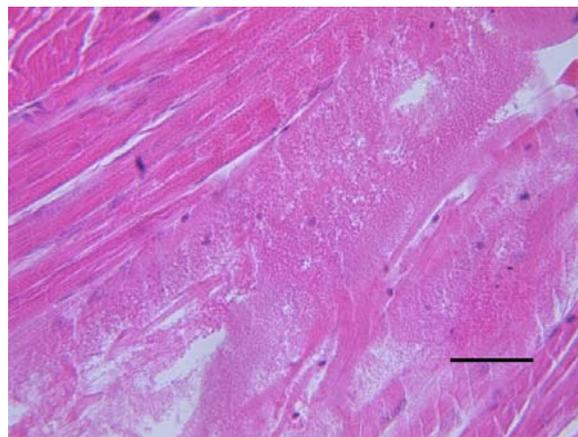


Figura 15 - Presença de hemolinfa entre as fibras musculares do camarão 8 da espécie *F. subtilis* do grupo desafiado. Escala 50 μ m.

A RT-PCR resultou na detecção de *amplicons* compatíveis com o controle positivo (284 pb) para a detecção de fragmentos genéticos do Vírus da Mionecrose Infecciosa. Esta

análise molecular mostrou que dos 100 animais desafiados apenas dez (10 %) se mostraram susceptíveis à infecção. Os animais do grupo controle também foram submetidos a análises de RT-PCR usando a mesma metodologia do Kit IQ2000 e todas as amostras foram negativas para o vírus IMN. Das dez amostras reagentes ao IMNV duas foram coletadas no 5º dia, uma no 10º dia, duas no 15º dia, uma no 20º dia e quatro no 30º de exposição. Quando da realização das análises histológicas os camarões 1; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 apresentaram alterações teciduais compatíveis com a enfermidade investigada. Durante a infecção experimental, apenas cinco camarões morreram e destes apenas dois foram reagentes para o IMNV sendo um no 5º outro no 10º dia que correspondem as amostras das trilhas 2 e 3 (Figura 15 e Tabela II).

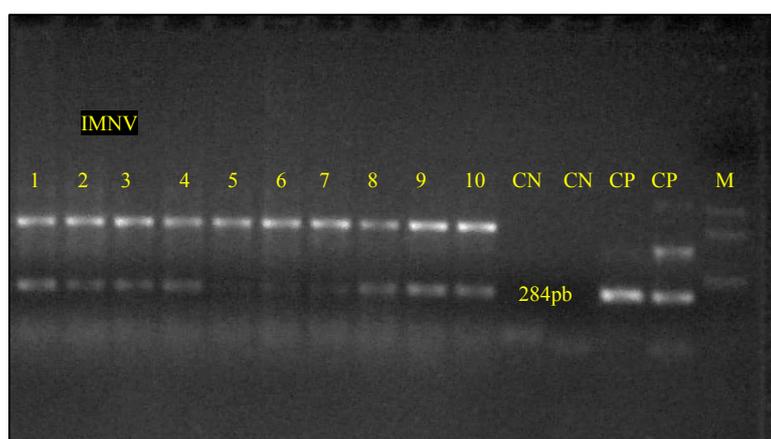


Figura 16- As trilhas 1, 2 representam detecção do IMNV no 5º dia após desafio. A banda 3 representa detecção no 10º dia pós desafio, as bandas 4 e 5 detecção do vírus no 15º dia após desafio, a banda 6 detecção do vírus no 20º e as bandas 7, 8, 9 e 10 reagentes no 30º dia de desafio. CN= Controle Negativo, CP= Controle Positivo e M = marcador de peso molecular: 848pb; 630pb e 333pb.

A espécie *L. vannamei* mostrou ter uma maior mortalidade próximo ao final do ciclo de cultivo quando infectados com IMNV (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004), pois, o tempo que o vírus IMN leva para causar mortalidade é relativamente longo, o tecido muscular que é o principal alvo da infecção é resistente, podendo suportar mais danos do que órgãos vitais como, por exemplo, o hepatopâncreas (Tang *et al*, 2005).

Estudos anteriores utilizando a ferramenta de hibridização *in situ* através de bioensaios demonstraram que as espécies de camarões: *L. vanannei*, *L. stylirostris* e *P. monodon* são suscetíveis à infecção pelo IMNV, contudo foi constatado que o vírus IMN não é

particularmente virulento, quando comparado a outros vírus como TSV, YHV e WSSV (Tang *et al.*, 2005).

De acordo com o teste t de Student para dados independentes, não houve diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre a Contagem Total de Hemócitos (CTH) do grupo desafiado e grupo controle nas coletas do 5°, 10°, 15° e 20° dia. Na coleta do 30° dia os dois grupos apresentaram resultados estatisticamente diferentes e dos 20 camarões que foram amostrados nesta coleta, 4 se apresentaram reagentes as análises de PCR e nas análises histológicas foi possível observar hemolinfa e hemócitos entre as fibras musculares dos camarões (8; 9; 10). Este processo pode ser resultante da reação do sistema imune à ação viral no organismo do camarão, diminuindo o número de hemócitos em circulação, uma vez que estas células são mobilizadas para os sítios de infecção (Figura 16).

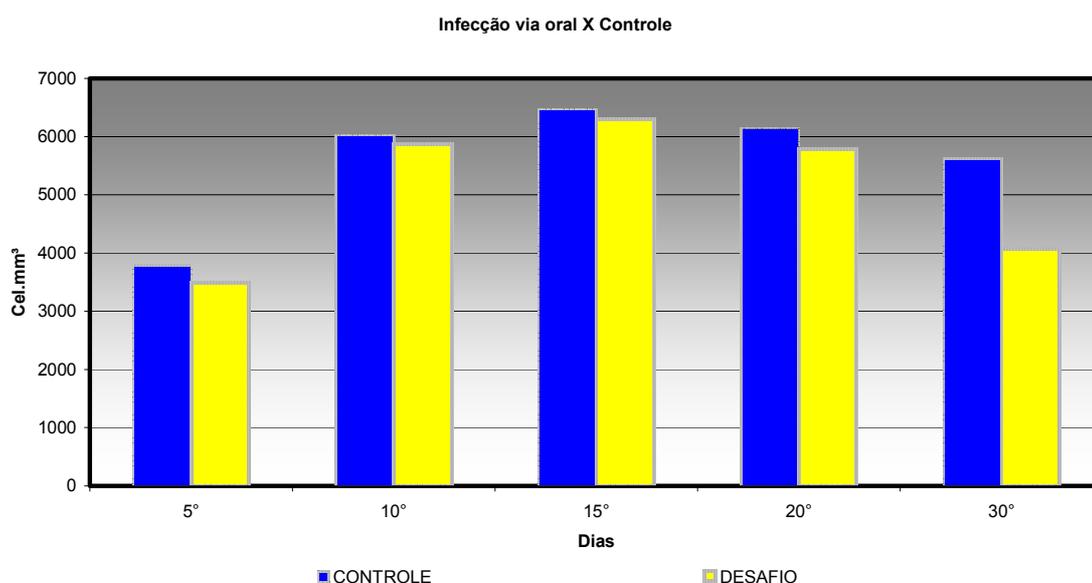


Figura 17 – Valores da Contagem total de hemócitos dos camarões desafiados via oral e do grupo controle em diferentes dias de exposição do IMNV, mostrando uma diferença significativa no 30° dia ($p < 0,005$).

A CTH mostrou-se variável dentro do grupo de camarões desafiados ao longo do experimento. Esta variação é um fenômeno bastante conhecido em crustáceos incluindo camarões, onde a CTH pode mudar influenciada por diversos fatores, como diferentes estados fisiológicos (LE MOULLAC *et al.*, 1997; MAGGIONI *et al.*, 2004) ou alterações ambientais (LE MOULLAC e HAFFNER, 2000; PERAZZOLO *et al.*, 2002). Reduções na CTH foram relatadas em camarões *L. vannamei* infectados por TSV e em *P. monodon* e *P. indicus*

infectados pelo WSSV (SONG *et al.*, 2003; VAN DE BRAAK *et al.*, 2002b; YOGANANDHAN *et al.*, 2003).

Diversos fatores podem causar uma redução do número de hemócitos, como infiltração hemocítica nos tecidos infectados, baixa substituição celular hematopoiética ou a morte hemocítica por apoptose. Com efeito, reações inflamatórias com grande infiltração de hemócitos foram relatadas em camarão fortemente infectados pelo IMNV, especialmente nos músculos estriados do abdômen (TANG *et al.*, 2005; POULOS *et al.*, 2006, ANDRADE *et al.*, 2008).

Estudos realizados com camarões *L. vannamei* infectados com o vírus IMN observando alterações em vários parâmetros imunológicos, demonstraram mudanças significativas na contagem total de hemócitos em indivíduos no estágio avançados da infecção com redução hemocítica de 30% (COSTA *et al.*, 2009).

5. CONCLUSÃO

1 - O estudo demonstrou que a espécie nativa *Farfantepenaeus subtilis*, que habita a costa brasileira capturada no Estuário do Rio Pacoti, Estado do Ceará é susceptível ao vírus IMN.

2 - A manifestação do vírus IMNV mostrou menor mortalidade e impacto na espécie nativa do que na espécie *L. vanannei*, sugerindo que a espécie *Farfantepenaeus subtilis* representa uma possível alternativa para ampliar o número de espécies cultivadas, contribuindo para a sustentabilidade do setor produtivo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC - Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Projeto executivo para apoio político ao desenvolvimento do camarão marinho cultivado. p. 11. Recife, Janeiro de 2004.

AGOSTINHO A. A.; GOMES L. C.; PELICICE F. M. Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem, cap. 6.3, p.274-306, 2007.

AGUIRRE-GÚZMAN, G.; RUÍZ, H. M.; ASCENCIO, F. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in diseases of cultivated shrimp. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 35, n. 15, p. 1395-1404, Nov 2004.

ANDRADE, T.P.D.; REDMAN, R.M.; LIGHTNER, D.V. Evaluation of the preservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**. v. 278, p. 179-183, 2008.

ANDRADE, T.P.D.; SRISUVAN, T.; TANG, K.F.J.; LIGHTNER, D.V. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**. v. 264, p. 9-15, 2007.

BACHÈRE, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, Amsterdam, v.19, p, 3-11, 2000.

BACHÈRE, E.; FUCHS, R.; SÖDERHALL K .Special issue on shrimp response to pathogens. **Aquaculture**, p.191, 2000.

BAUCHAU, A.G. Crustaceans. In: RATCLIFFE, N.A. e ROWLEY, A.F. (eds.) **Invertebrate Blood Cells**. v. 2., London, Academic Press Inc. p. 385-420,1981.

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

BARRACCO, M. A., PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Inmunologia en camarones - Capitulo 6. In: MORALES, V e CUELLAR-ANGEL J. (eds). *Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón*. Ed. CYTED, pp. 169 – 224. 2008.

BARREIRA, L. 2009. No Ce, exportações cai 78,51%. Disponível em: <http://diariodonordeste.globo.com/materia.asp?codigo=548757>. Acesso em: 03/04/09.

BELL, T.A., LIGHTNER, D.V., A Handboock of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, USA. 1988.

BELL, T.A., LIGHTNER, D.V. IHHN virus: infectivity and pathogenicity studies in *Penaeus stylirostris* and *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.38, p.185-194, 1984.

BOYD, C. E. Manejo do solo e da qualidade da água em viveiros para aqüicultura. Departamento de Aqüicultura Mogiana Alimentos, S.A. Campinas, SP. p. 55, 1997.

BRASIL. Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado: segmento de mercado/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Pesca e Aquicultura. - Brasília: MAPA/SARCC/DAP, CNPq, ABCC, p.276, 2001.

BRIGGS, M. R. P., FUNGE-SMITH, S. J., SUBASINGHE, R., PHILLIPS, M., Introductions and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP Publication 2004/10. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand. 2004.

BROCK, J. **Manual de enfermidades**. Guayaquil, Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, p. 45, 1990.

BROCK, J. A.; MAIN, K. A guide to the common problems and diseases of cultured *Penaeus vannamei*. **Oceanic Institute**, Honolulu, p. 241, 1994.

CARBAJAL-SÁNCHEZ, I. S. CASTRO-LONGORIA, R.; GRIJALVA-CHON, J. M. Experimental white spot syndrome virus challenge of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone) at different salinities. **Aquaculture Research**. v. 39, p.1588-1596, 2008.

CERVIGÓN, F.; CIPRIANI, R.; FISCHER, W.; GARIBALDI, L.; HENDRICKX, M.; LEMUS, A. J.; MÁRQUEZ, R.; POUTIERS, J. M.; ROBAINA, G. & RODRIGUEZ, B. Guia de campo de las especies comerciales marinas y de aguas salobres de la costa septentrional de sur america. Fichas FAO de identificación de especies para los fines de la pesca. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación. Roma.1992.

CHAYABURAKUL, K.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; SRIURAIRATTANA, S.; LIGHTNER, D. V.; NELSON, K. T. Different responses to infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in *Penaeus monodon* and *P. vannamei*, **Dis Aquat Org** v. 67, p. 191-200, 2005.

CHIU, C.; GUU, Y.; LIU, C.; PAN, T.; CHENG, W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, United Kingdom, v. 23, n. 2, p. 364 – 377, 2007.

COÊLHO, M. G. L. Susceptibilidade do camarão rosa *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967) ao vírus da Infecção Hipodermal e Necrose Hematopóietica (IHHNV). LABOMAR-UFC, Fortaleza, 2006.

COSTA, A. M.; BUGLIONE C. C.; BEZERRA, F. L.; MARTINS, P. C. C.; BARRACCO, M. A. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**. v. 291, p. 141–146, 2009.

COWLEY, J. A.; DIMMOCK, C. M.; WALKER, P. J. Gill associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. **J. Gen. Virol.** v. 81, p. 1473-1481, 2000.

D'INCAO, F. Taxonomia, padrões distribucionais e ecológicos dos Dendrobranchiata (Crustacea : Decapoda) do Brasil e Atlântico Ocidental. p. 365. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 1995.

FAO - Food and Agriculture Organization of United Nations. Health management and biosecurity maintenance in White shrimp (*Penaeus vannamei*) hatcheries in Latin America. Roma, 2003.

_____. The state of world fisheries and aquaculture. Roma, 2006.

_____. Estatísticas da Produção Mundial de Pescado em 2006 – FISHSTAT, ROMA, 2008.

FEGAN, D. F.; CLIFFORD, H.C. Health Management for Viral Diseases in Shrimp Farms. In: Browdy, Craig, L. and Daryl, E. Jory, editors. The New Wave, Proceedings of The Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture 2001. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States. p.168-198, 2001.

FLEGEL, T. W. Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 433–442, 1997.

GESTEIRA, T. C. V. Enfermidades infecciosas registradas na carcinicultura brasileira. In: Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. ABRAPOA. Maringá: Silva-Souza, p. 137-158, 2006.

GRAF, C. GERVAIS, N.; FERNANDES, M. C. P.; AYALA, J. C. Transmissão da síndrome da necrose idiopática muscular (NIM) em *Litopenaeus vannamei*. **Revista da ABCC**, n.5. v. 4. p. 45-47, 2003.

HASSON, K.W.; FAN, Y.; VARNER, P.W. Current in ectious marine shrimp diseases of concern in the United States. In: Corean-US Seminar and Workshop on Sustainable Marine Shrimp Farming. Incheon 2005. Final Report. West Sea Fisheries Research Institute/NOAA, p.24-26, 2005.

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

HERNÁNDEZ, J.Z; NUNES, A.J.P. Biossegurança no cultivo de camarão marinho: qualidade da água e fatores ambientais. **Revista da ABCC**, 3: p. 55-59, 2001.

HOLTHUIS, L. B. FAO species catalogue. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. **FAO Fisheries Synopsis**, n.125, v. 1. p. 1-271, 1980.

ISAAC, V; DIAS NETO, J; DAMASCENO, F. G. Camarão rosa da costa Norte: biologia, dinâmica e administração pesqueira. Brasília: IBAMA – Coleção Meio Ambiente. (Série Estudo Pesca). p. 187, 1992.

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

JIRAVANICHPAISAL P, LEE BL, SÖDERHÄLL K. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**. v. 211 p, 213–36. 2006.

JOHANSSON MW, KEYSER P, SRITUNYALUKSANA K, SÖDERHÄLL K. Crustacean hemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**. v. 191, p. 45–52, 2000.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. *Editora Santos*, p. 123., São Paulo, 1983.

KALAGAYAN, G.; GODIN, D.; KANNA, R.; HAGINO, G.; SWEENEY, J.; WYBAN, J.; BROCK, J. IHHN virus as an etiological factor in runt-deformity syndrome of juvenile *Penaeus vannamei* cultured in Hawaii. **J. World Aquaculture Soc**, v.22, p.235-243, 1991.

KROL, R.; HAWKINS, W.E.; OVERSTREET, R.M. Rickettsial and mollicute infections in Texas. **Vet. Pathol.** V. 29, p, 269-277, 1991.

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

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

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

LIGHTNER, D. V. Shrimp virus diseases: diagnostic, distribution and management. In: WYBAN, J. Proceedings of the special session on shrimp farming. Florida. **World Aquaculture Society**. p. 238-253, 1992.

LIGHTNER, D. V. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: Epizootiology, distribution and the impact on international trade of two penaeid shrimp viruses in the Americas. **Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.** v. 15, p. 579-601, 1996a.

LIGHTNER, D.V. (ed.) A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for disease of cultured penaeid shrimp. **World Aquaculture Society**. Baton Rouge, Louisiana, USA, 1996b.

LIGHTNER, D. V. Manual de patologia y procedimientos de diagnóstico para enfermedades de camarões peneídeos. Universidad Autónoma Metropolitana. 1997.

LIGHTNER, D.V. Biosecurity in Shrimp Farming: Pathogen Exclusion through use of SPF Stock and routine Surveillance. **J. World Aquac. Soc.** 36, p.229-248, 2005.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M. Shrimp diseases and current diagnostics methods. **Aquaculture**, 164: p. 201-220, 1998.

LIGHTNER, D.V.; REDMAN, R.M.; BELL, T.A. Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis a newly recognized virus disease of penaeid shrimp. **J. Invertebr. Pathol.** v. 42, p. 62-70, 1983.

LIGHTNER, DV. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV: History in the Americas and Current Status. In: Aquaculture and Pathobiology of Crustacean and Other Species. Proceedings of 32nd UJNR Aquaculture Panel Symposium, November 17-18 and 20th 2003, Davis and Santa Barbara, California, USA. p. 1-20, 2003.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; ANDREAS, T.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis (IMN): a new virus diseases of *Litopenaeus vannamei*. In: **Livro de Resumos do Aquaculture**. Honolulu, Havaí, EUA. 2004a.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; ANDRADE, T. P. D.; BONAMI, J. R. Infectious myonecrosis (IMN): a new vírus disease of *Litopenaeus vannamei*. In: Aquaculture 2004 book of abstracts. **World Aquaculture Society**, Boton Rouge, LA. p. 353, 2004b.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; PASSOS DE ANDRADE, T.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis: New Disease in Pacific White Shrimp. **The advocate Global Aquaculture Alliance**, p. 17-22, 2004c.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R. Inmunologia en camarones - Capitulo 2. In: MORALES, V e CUELLAR-ANGEL J. (eds). *Guía Práctica de Inmunología y Patología del Camarón*. Ed. CYTED, pp. 57 – 116. 2008.

LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, P.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; RUKPRATANPORN, S.; SITHIGORNGUL, W.; MENASVETA,P. Differences in susceptibility of palaemonid shrimp species to yellow head virus (YHV) infection. **Dis Aquat Org** v. 64, p. 5-12, 2005.

MAGGIONI, R.; ROGERS, A. D.; MACLEAN, N.; D'INCAO, F. Molecular Phylogeny of Western Atlantic *Farfantepenaeus* and *Litopenaues* shrimp Based on Mitochondrial 16S Partial Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 18, n° 1. p. 66-73, 2001.

MAGGIONI, D. G. S. Avaliação de parâmetros hemato-imunológicos, em fêmeas ablasdas de *Litopenaeus vannamei*, em associação a uma dieta com diferentes superdosagens de ácido ascórbico. 2002. Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, 2002.

[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**. 241, p. 501-515, 2004.

MAIA, E. P. Progresso e Perspectivas da Carcinicultura Marinha No Brasil. In: Simpósio Brasileiro Sobre Cultivo De Camarão. I Congresso Brasileiro De Aquicultura. **Associação Brasileira De Criadores De Camarão – ABCC**, João Pessoa, Paraíba, Brasil, p. 185-196, 1983.

MAIA, E. P.; NUNES. A. J. P. Cultivo de *Farfantepenaeus subtilis*: Resultados das performances de engorda intensiva. **Panorama da Aquicultura**. v. 13,nº79. p. 36-41, 2003.

MARQUES, M. R. F.; MOSER, J. R.; MÜLER, C. I. In: SILVA-SOUZA, A. T. (Org.). Virologia de crustáceos e métodos moleculares de diagnóstico. **Sanidade de Organismos Aquáticos**. ABRAPOA, Maringá, p. 159-184, 2006.

MARTINS, P. C. C. Cultivo de camarão marinho. In: Sanidade de organismos aquáticos no Brasil. ABRAPOA, Maringá: Silva-Souza, p. 121-135, 2006.

MARTINS, P.C.C.; GESTEIRA, T.C.V.; VIEIRA, R.H.S.F. Monitoramento da ocorrência de necrose muscular no cultivo de camarão marinho *Litopenaeus vannamei*, no nordeste do Brasil. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos aquáticos, 8.; Encontro latino-americano de Patologistas de Organismos Aquáticos, 8., Resumos... Laguna, Abrapoa, p. 16, 2004.

NUNES, A. J. P., GESTEIRA, T. C. V. & GODDARD, S. Food ingestion and assimilation by the Southern brown shrimp *Penaeus subtilis* under semi-intensive culture in NE Brazil. **Aquaculture**, v.149, p. 121-136, 1997.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C.; GESTEIRA, T. C. Carcinicultura Ameaçada. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro. v. 14, p. 37-57, 2004.

NUNES, A J. P. *Penaeus subtilis*: Dieta e Manejo Alimentar em Viveiros de Cultivo Semi-Intensivo no Nordeste. **Panorama da Aqüicultura**, v. 5, p.10-14, 1995.

OIE - OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. OIE Listed diseases. Disponível em: http://www.oie.int/eng/maladies/en_classification2008.htm?e1d7 Acesso em 03.01.2009.

OVERSTREET, R. M.; LIGHTNER D. V; HASSON, K. W.; MCILWAIN, S.; LOTZ. J.M. Susceptibility to Taura Syndrome Virus of Some Penaeid Shrimp Species Native to the Gulf of Mexico and the Southeastern United States. **Journal of Invertebrate Pathology** v. 69, p 165–176, 1997.

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

PEREIRA, A. M. L.; MENDES, E. S.; GESTEIRA, T. C. V. Mionecrosis infecciosa viral (IMNV) y sus implicaciones em los cultivos de camarones brasileños. In: patología e Inmumología de Camarones Penaeidos. CYTED-RED II-D: Red Vannamei, Panamá: Morales & Cuéllar-Anjel, p. 96-106, 2008.

PEREZ -FARFANTE, I. A new species and two new subspecies of shrimp of the genus *Penaeus* from western Atlantic. **Proc. Biol. Soc. Wash**, v.80, p. 83-100, 1967.

PÉREZ-FARFANTE, I. Western Atlantic shrimps of the genus *Penaeus*. **Fishery Bulletin**, v. 67, p.461-591, 1969.

PEREZ -FARFANTE, I. Spermatophores and Thelyca of the American White shrimp, genus *Penaeus*, subgenus *Litopenaeus*. **Fish. Bull.**, 73, p. 463-486, 1975.

PEREZ-FARFANTE, I. Illustrated key to penaeoid shrimp of commerce in the Americas. NOAA Technical Report. Departament of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. **National Marine Fisheries Service**, p. 32, 1988.

PEREZ- FARFANTE, I.; KENSLEY, B. F. Peaneoide and Sergestoid shrimps and prawns of the world: keys and diagnoses for the families and genera. *Memoires du Museum National d'Hostoire Naturelle*. v. 175, p 1-223, 1997.

PEREZ-LINARES, J.; CADENA.M.; RANGEL. C.; UNZUETA-BUSTAMANTE, M. L.; OCHOA, J. L. Effect of *Schizothrix calcicola* on White shrimp *litopenaeus vannamei* (*penaeus vannamei*) postlarvae. **Aquaculture**. v. 128, p. 55-65, 2003.

PINHEIRO, A. C. A. S.; LIMA, A. P. S.; SOUZA, M. E.; NETO, E. C. L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, V. S. P.; COIMBRA, M. R. M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**. v. 262, p. 17-22, 2007.

POULOS. B.T., TANG, K.F.J., PANTOJA, C.R., BONAMI, J.R., LIGHTNER, D.V., Purification and Characterization of Infectious Myonecrosis Virus of Penaeid Shrimp. **J. Gen. Virol.** 87, p. 987-996, 2006.

PUTHAWIBOOL, T.; SENAPIN, S.; KIATPATHOMCHAI, W.; FLEGEL, T. W. Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of virological methods.** v. 156, p. 27-31, 2009.

QUEIROZ A. B. J. Análise ambiental do estado de conservação do baixo curso do Rio Pacoti Ceará. 2005. 117f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) – Programa Regional de Desenvolvimento e Meio Ambiente, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2005

ROCHA I. P., RODRIGUES J.; AMORIM L. A carcinicultura brasileira em 2003. **Revista da ABCC.** Ano 6 nº 1, p. 30-36, 2004.

ROCHA, I. P. Desempenho da Carcinicultura brasileira em 2007: Desafios e Oportunidades para 2008. **Revista da ABCC.** Ano 10 nº 1: p. 20-23, 2008

ROCHA, I. P. Carcinicultura Brasileira: impactos econômicos e socioambientais. **Aquicultura & Pesca.** Ano V, nº 38, p. 20 – 24, 2009.

RODRIGUES, J. Carcinicultura Marinha-desempenho 2004, **Revista da ABCC** v. 2, p. 38–44, 2005.

SANTANA I. C. H. Estudo Morfológico do Sistema Reprodutor Feminino do Camarão *Farfantepenaeus subtilis* (Pérez-Farfante, 1967), do Litoral Cearense. 2005. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) Programa de Pós-graduação em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

SEIFFERT, W. Q.; WIINCKLER, S.; MAGGIONI, D. A mancha Branca em Santa Catarina. **Panorama da Aquicultura.** p. 51-53, 2005.

SENAPIN, S., PHEWSAIYA K., BRIGGS, M., FLEGEL, T.W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture,** 266, p. 32-38, 2007.

SMITH, P.T. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). **Toxicon**, v. 34, p. 857-869, 1996.

SNIESZKO, S. F. Diseases of fish and their control in the U.S. In: **The two lakes fishery management training course report**, London, Jansen, p. 55-66, 1973.

SRITUNYALUCKSANA, K.; SÖDERHÄLL, K. The proPO and clotting system in crustaceans, **Aquaculture**, v.191, p.53-69, 2000.

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

SONG, Y. L.; YU, C. I.; LIEN, T.W.; HUAN, C.C.; LIN, M. N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish Shellf Immunol.** v. 14, p. 317-331, 2003.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Dis. Aquat. Org.** v. 63, p. 261-265, 2005.

VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq: Ministério da Ciência e tecnologia, p. 25-32, 2000.

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

VAN DE BRAAK, C. B.; BOTTERBLOM, M. H. A.; TAVERNE, N.; VAN MUISWINKEL, W. B.; ROMBOUT, J. H. W. M.; VAN DER KNAAP, W.P. W. The roles of haemocytes and the lymphoid organ in the clearance of injected *vibrio* bacteria in *Penaeus monodon* shrimp. **Fish Shellf. Immunol.**, v. 13, p. 293-309, 2002b.

VASEEHARAN, B.; JAYAKUMAR, R.; RAMASAMY, P. PCR-based detection of white spot syndrome virus in cultured and captured crustaceans in India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, p. 443-447, 2003.

VIEIRA, R. H. S. F.; GESTEIRA, T. C. V.; MAEQUES, L. C.; MARTINS, P. C.C.; MONTEIRO, C. M.; CARVALHO, R. L. *Vibrio* spp. E suas implicações em larviculturas de camarões marinhos. **Arq. Ciên. Mar**, v. 33, p. 107-112, 2000.

VINATEA ARANA, L. Produção de pós-larvas de camarão marinho. Florianópolis, UFSC, p.157-179, 1996.

VINATEA ARANA, L. Princípios Químicos de Qualidade da Água em Aqüicultura: uma revisão para peixes e camarões. 2ª ed. Florianópolis, Ed. Da UFSC. 2004.

WANG, Q; WHITE, B. L; REDMAN, R. M; LIGHTNER, D.V. Per os challenge of *Litopenaeus vannamei* postlarvae and *Farfantepenaeus duorarum* juveniles with six geographic isolates of White Spot Syndrome Virus. **Aquaculture**. v. 170, p. 179-194, 1999.

WAIKHOM,G; JOHM, K. J; GEORGE, M. R; JEYASEELAN, M.J.P. Differential host passaging alter pathogenicity and induces genomic variation in White Spot Syndrome Virus. **Aquaculture**. v. 261, p.54-63,2006.

YEH, SHINN-PYNG; CHEN, YING-NAN; HSIEH, SHU-LING; CHENG W., LIU CHUN-HUNG. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis vírus. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 26, p. 582–588, 2009.

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