

EFEITO DE POLISSACARÍDEOS SULFATADOS DE ALGAS MARINHAS VERMELHAS EM PÓS-LARVAS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*, SUBMETIDAS AO TESTE DE ESTRESSE SALINO

Effect of sulfated polysaccharides from red marine algae on *Litopenaeus vannamei* post-larvae, submitted to the saline stress test

Paula Cristina Walger de Camargo Lima¹, Valeska Martins Torres², José Júnior Sousa³, José Ariévilo Gurgel Rodrigues⁴, Wladimir Ronald Lobo Farias⁵

RESUMO

O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da administração dos polissacarídeos sulfatados (PS) extraídos das algas marinhas vermelhas *Champia feldmannii*, *Halymenia pseudoforesia* e *Gracilaria birdiae* na sobrevivência de pós-larvas (PL's) do camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidas ao teste de estresse salino, empregado para verificar a qualidade dos indivíduos. Os PS foram administrados nas concentrações 0.0 mg.L⁻¹ (Controle); 1.0 mg.L⁻¹ e 2.0 mg.L⁻¹ (C. *feldmannii*); 2.0 mg.L⁻¹ e 4.0 mg.L⁻¹ (H. *pseudoforesia*) e 2.0 mg.L⁻¹ e 4.0 mg.L⁻¹ (G. *birdiae*) e o teste de estresse realizado após o período de administração. Para isso, 100 indivíduos de cada tratamento, aclimatados em salinidade 30, foram transferidos para recipientes contendo água doce, onde permaneceram por uma hora e, em seguida, novamente retornados à condição original, permanecendo por mais 30 minutos. O procedimento foi repetido quatro vezes para cada tratamento, sendo registrado o número de sobreviventes no final dos ensaios. Os valores médios de sobrevivência foram submetidos à Análise de Variância e ao teste de Tukey. A maior sobrevivência foi observada para o tratamento G. *birdiae* 2.0 mg.L⁻¹ (94,36%), a qual foi significativamente superior aos menores valores registrados: controle (76,75%), C. *feldmannii* 1.0 mg.L⁻¹ e 2.0 mg.L⁻¹ (75,37% e 74,94%). Os resultados revelam que os PS da G. *birdiae* (2.0 mg.L⁻¹) promoveram uma maior resistência às PL's de *L. vannamei*, submetidas ao estresse salino, sugerindo um possível efeito protetor deste composto, o qual merece ser investigado em estudos posteriores.

Palavras-chaves: larvicultura, *Litopenaeus vannamei*, macroalgas, polissacarídeos sulfatados, choque salino.

ABSTRACT

The experiment was carried out to evaluate the effect of the administration of sulfate polysaccharides (SP) extracted from marine red algae *Champia feldmannii*, *Halymenia pseudoforesia* e *Gracilaria birdiae*, on the survival of *Litopenaeus vannamei* shrimp post-larvae (PL's), submitted to the saline stress test, used to verify the shrimp quality. The SP were administered in concentrations 0.0 mg.L⁻¹ (Control); 1.0 mg.L⁻¹ and 2.0 mg.L⁻¹ (C. *feldmannii*); 2.0 mg.L⁻¹ and 4.0 mg.L⁻¹ (H. *pseudoforesia*) e 2.0 mg.L⁻¹ and 4.0 mg.L⁻¹ (G. *birdiae*) and the stress test carried out after the administration period. Therefore, 100 individuals from each treatment, acclimated to salinity 30, were transferred to recipients containing freshwater, where they stay for one hour, and then restored again to original condition and stay there for more 30 minutes. The procedure was repeated four times for each treatment, being recorded the number of survivors at the end of the trials. Survival average values were submitted to the ANOVA and Tukey Test ($\alpha=0.05$). Higher survival was observed for G. *birdiae* 2.0 mg.L⁻¹ treatment (94.36%), which was significantly superior than the lowest values recorded on Control (76.75%) and C. *feldmannii* 1.0 mg.L⁻¹ and 2.0 mg.L⁻¹ (75.37% e 74.94%) treatment. The results show that G. *birdiae* (2.0 mg.L⁻¹) SP ascribed a greater resistance to *L. vannamei* PL's, submitted to saline stress, suggesting a possible protector effect of this compound, which should be investigated in subsequent studies.

Key words: larviculture, *Litopenaeus vannamei*, macroalgae, sulfated polysaccharides, saline shock

¹ Bolsista CNPq, mestranda em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará. E-mail: paula.camargo.lima@gmail.com

² Bolsista CAPES, mestranda em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará.

³ Aluno de graduação em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará

⁴ Doutorando em Biotecnologia em Recursos Naturais da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Estadual do Ceará.

⁵ Professor Adjunto do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, responsável pelos Laboratórios de Bioquímica Marinha e Aqüicultura.

INTRODUÇÃO

A qualidade das pós-larvas (PL's) é um dos aspectos mais importantes para se obter bons resultados durante a engorda e evitar a proliferação de enfermidades na carcinicultura (Santos, 2005). A avaliação da qualidade das PL's pode ser feita através de uma inspeção visual, seja a olho nu ou ao microscópio, ou através de testes de estresse, os quais funcionam como ferramentas úteis na determinação de larvas de boa qualidade, sugerindo um bom nível de sobrevivência durante o transporte e aclimação, além de melhores taxas de crescimento nas fazendas de engorda (Bauman & Jamandre, 1990; Browdy, 1998).

Os testes de estresse, os quais são indicados para estabelecimentos comerciais em função da simplicidade e praticidade de seu processo (Gua-jardo *et al.*, 1994), consistem em avaliar a sobrevivência de uma amostra de PL's quando submetidas a variações bruscas de determinados parâmetros, como temperatura e salinidade, num determinado período de tempo (Olin & Fast, 1992; Barbieri & Ostrenski, 2001).

A produção, o transporte, a aclimação e a estocagem nos viveiros de engorda, constituem operações importantes na carcinicultura, exigindo uma minuciosa atenção e planejamento (Belframe & Seiffert, 1997). Durante estas etapas, os organismos ficam expostos a diversas situações de estresse, como variações bruscas na temperatura, oxigênio dissolvido e salinidade, as quais podem causar o declínio das defesas naturais dos camarões, deixando-os enfraquecidos e sujeitos às contaminações por organismos patógenos (Santos, 2005).

Dessa forma, o uso de compostos capazes de aumentar a imunocompetência dos camarões, em paralelo a um bom manejo do cultivo, desponta como uma ferramenta promissora na busca de uma maior proteção imunológica durante a instalação de infecções no ambiente de cultivo e exposições a fatores ambientais potencialmente estressantes (Barracco *et al.*, 2007). Dentre estes compostos, os polissacarídeos sulfatados (PS) e o extrato de diversas macroalgas marinhas vêm sendo amplamente estudados, apresentando resultados significativos na sobrevivência de camarões expostos, experimentalmente, à condições adversas de estresse e a microrganismos patógenos (Huang *et al.*, 2006; Rodrigues, 2006; Yeh *et al.*, 2006; Fu *et al.*, 2007; Barroso *et al.* 2007).

Nesse trabalho foi avaliado o efeito da administração dos PS das algas marinhas vermelhas *Champia feldmannii*, *Halymenia pseudoforesia* e *Gracilaria birdiae*, sobre o aumento da resistência de PL's do

camarão *Litopenaeus vannamei* submetidas ao teste de estresse por choque salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das algas marinhas e extração dos polissacarídeos sulfatados

As algas vermelhas das espécies *Champia feldmannii*, *Halymenia pseudoforesia* e *Gracilaria birdiae* foram coletadas na Praia do Pacheco, município de Caucaia, litoral oeste de Fortaleza - Ceará. Em laboratório, as algas foram lavadas com água destilada, secas em estufa a 40 °C e cortadas em pequenos pedaços. Para extração dos PS, cinco gramas de cada alga seca foram hidratadas com 250 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 5,0 contendo 5 mM de EDTA e 5 mM de cisteína. Em seguida, o material foi submetido à digestão proteolítica através da adição de 17 mL de uma solução de papaína (30 mg.mL⁻¹), preparada com o mesmo tampão, e incubado a 60 °C, por 24 h. Após a incubação, a mistura foi filtrada e centrifugada (7.965 x g; 25 min; 4 °C). Os PS presentes no sobrenadante foram precipitados com a adição de 16 mL de CPC 10%, por 24 h em temperatura ambiente. O precipitado foi então lavado com 500 mL de CPC 0,05%, dissolvido em 250 mL de NaCl 2M : etanol absoluto (100:15, v/v) e submetido a uma nova precipitação, por 24 horas a 4 °C, através da adição de 300 mL de etanol absoluto. Em seguida, a mistura foi centrifugada e o precipitado submetido a duas lavagens com 250 mL de etanol 80% e uma com 150 mL de etanol absoluto. Os PS foram então levados à estufa a 60 °C, sendo obtidos, aproximadamente, dois gramas de material seco.

Obtenção e aclimação dos camarões

Cerca de 14.000 PL's de *L. vannamei* no estágio de PL₁₂ foram adquiridas do laboratório de larvicultura de camarão marinho Aquacrusta Marinha Ltda, pertencente à fazenda de camarão Artemiza, localizada no Município de Acaraú, Ceará. Os animais foram transportados em sacos plásticos de 30 L, com 2/3 de oxigênio e 1/3 de água na salinidade de 30. Já em laboratório, após a aclimação, as PL's foram aleatoriamente estocadas em sete aquários de vidro (20 L), cada um correspondente a um tratamento, na densidade de 100 PL's.L⁻¹, com aeração contínua e salinidade igual a presente nos sacos de transporte. O arraçoamento foi realizado quatro vezes ao dia e a renovação de 80% da água dos aquários foi feita diariamente.

Administração dos PS e teste de estresse

Os polissacarídeos sulfatados das algas vermelhas *C. feldmannii*, *H. pseudoforesia* e *G. birdiae* foram administrados diariamente, por seis dias, via imersão, após a renovação da água dos aquários. As dosagens utilizadas foram de 1,0 mg L⁻¹ e 2,0 mg.L⁻¹, para a espécie *C. feldmannii*, e de 2,0 mg.L⁻¹ e 4,0 mg.L⁻¹, para *H. pseudoforesia* e *G. birdiae*, sendo um dos aquários considerado como controle. As dosagens utilizadas foram estabelecidas a partir de ensaios anteriores, realizados em nosso laboratório (Rodrigues, 2006; Lima, 2007; Barroso et al., 2007; Torres, 2008). Vale ressaltar que as menores concentrações utilizadas para *C. feldmannii* se devem a dificuldade de encontrar a alga em seu habitat natural. Após o período de administração dos PS, as PL's foram submetidas ao teste de estresse por choque salino, de acordo com o descrito por Tackaert et al. (1989). Para isso, um total de 100 PL's de cada tratamento foi transferido para beckers de vidro distintos, contendo 1 L de água doce e aeração suave. Depois de 1 hora, as PL's foram transferidas para novos beckers, com água na salinidade de 30 e, após 30 minutos, realizada a contagem das sobreviventes. O procedimento foi repetido quatro vezes para cada tratamento, sendo as PL's descartadas, após o término de cada amostragem.

Análise estatística

Os dados médios de sobrevivência foram analisados com auxílio do programa STATISTICA, ver-

são 6.0, utilizando a análise de variância com fator único (ANOVA) no nível de significância de 5% e, posteriormente, o teste de Tukey, quando encontrada diferença significativa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Análise de Variância Univariada (ANOVA) detectou diferença significativa ($F = 4,316$; $p = 0,005$) na sobrevivência média entre os tratamentos (Figura 1).

As sobrevivências médias encontradas para os tratamentos referentes à alga *C. feldmannii*, 1,0 mg.L⁻¹ (75,37%) e 2,0 mg.L⁻¹ (74,94%), não apresentaram diferenças significativas em relação ao tratamento controle (76,75%) (Figura 1). Estes resultados corroboram com Torres (2008), o qual verificou que os PS da mesma alga, administrados nas concentrações 0,1 mg.L⁻¹, 0,5 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹, não conferiram em um aumento na sobrevivência de juvenis de *L. vannamei*, quando submetidos a supressão temporária da aeração, não sendo observado um aumento da sobrevivência com o aumento da dosagem para 4,0 mg.L⁻¹.

Embora os valores médios registrados para os indivíduos administrados com os PS da alga *H. pseudoforesia* 2,0 mg.L⁻¹ (84,17%) e 4,0 mg.L⁻¹ (87,1%) tenham sido superior ao do controle, não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (Figura 1). Por outro lado, Rodrigues (2006) encontrou um aumento significativo na sobrevivência de juvenis de *L. vannamei*, administrados com 1,0 mg.L⁻¹ dos PS da mesma alga, após supressão da renovação da água dos aquários, sugerindo que menores dosagens dos PS de *H. pseudoforesia* sejam mais efetivas no aumento

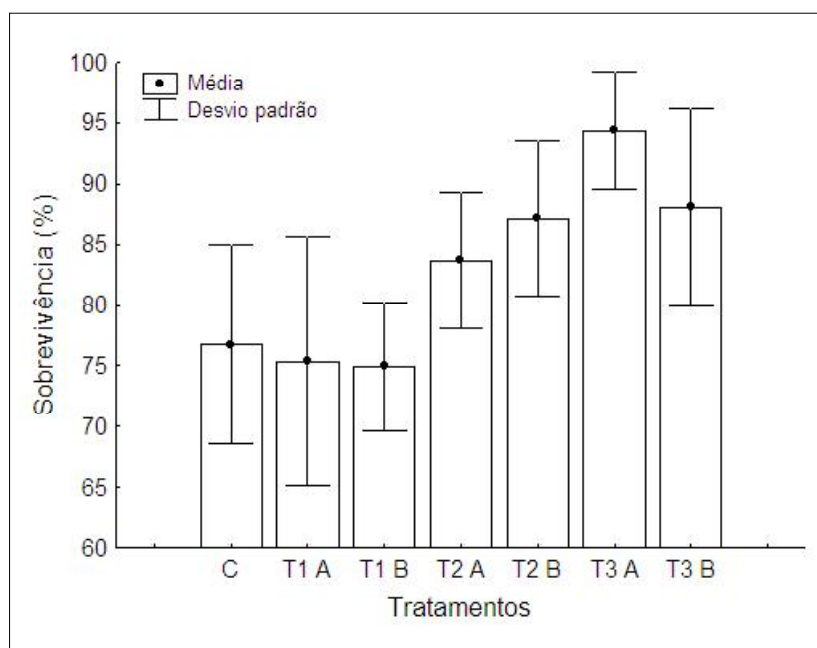


Figura 1 - Sobrevivência (%) média (\pm DP) das PL's de *L. vannamei*, de cada tratamento, submetidas a estresse por choque salino. Onde: C = Controle; T1A = *Champia feldmannii* 1,0 mg.L⁻¹; T1B = *Champia feldmannii* 2,0 mg.L⁻¹; T2A = *Halymenia pseudoforesia* 2,0 mg.L⁻¹; T2B = *Halymenia pseudoforesia* 4,0 mg.L⁻¹; T3A = *Gracilaria birdiae* 2,0 mg.L⁻¹; T3B = *Gracilaria birdiae* 4,0 mg.L⁻¹.

da resistência de camarões. Resultados similares foram reportados por Sung et al. (1994), os quais verificaram que camarões *Penaeus monodon* submetidos a banhos de imersão com a maior dose de β -1,3 glicana testada ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$), apresentaram menor resistência à vibrioses, sugerindo um efeito imunossupressor ao composto. Da mesma forma, Barroso et al. (2007) e Huang et al. (2006) reportam que a administração oral das maiores doses utilizadas dos PS da alga vermelha *Botryocladia occidentalis* ($1,5 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) e da alga parda *Sargassum fusiforme* (2,0%), respectivamente, causaram a diminuição da sobrevivência e a inibição das respostas imunes em camarões *L. vannamei* e *Fenneropenaeus chinensis*.

Em relação aos PS da alga *G. birdiae*, o tratamento referente à dose $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ apresentou a maior sobrevivência média do experimento (94,36%), a qual foi significativamente superior ($p=0,03$) às observadas para o controle (76,75%), *C. feldmannii* $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (75,37%) e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ (74,94%). Os resultados indicam, ainda, a ausência de uma dose-dependência, não sendo evidenciado nenhum aumento significativo na sobrevivência com a duplicação da dosagem para 4 mg.L^{-1} (88%). Resultados semelhantes foram obtidos por Lima (2007), ao avaliar a sobrevivência de PL's de *L. vannamei* administradas com os PS da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* ($2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e submetidas ao mesmo teste de estresse salino.

Em relação ao período de administração dos compostos, no presente estudo, apenas seis dias foram suficientes para uma aparente imunoestimulação das PL's de *L. vannamei* administradas com $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ dos PS da alga *G. birdiae*.

O mesmo resultado, mais uma vez, foi observado por Lima (2007) ao verificar uma maior resistência das PL's de *L. vannamei*, após seis dias de administração dos PS da alga parda *S. schroederi*. Já Sung et al. (1994) e Dugger (1999) relatam que a administração de dietas contendo β -1,3 glicana, duas vezes por semana, é suficiente para manter uma ativação celular ótima do sistema imune de crustáceos. Por outro lado, segundo Campa-Córdoba et al. (2002), apenas uma exposição de 6 horas em β -1,3 glicana ou de 3 horas em laminarina, extraída da alga parda *Laminaria digitata*, foram suficientes para ativar respostas imunológicas em camarões *L. vannamei*.

Como é possível observar, existe uma grande discrepância em relação aos resultados referentes à dosagem ideal e ao tempo de administração dos compostos, sendo estes fatores fundamentais para a obtenção de resultados satisfatórios na imunoestimulação de crustáceos.

Os resultados do presente trabalho indicam que os PS da alga *G. birdiae*, quando administrados, via imersão, por seis dias, na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ promoveram uma maior sobrevivência das PL's de *L. vannamei* submetidas ao teste de estresse salino, não sendo constatada uma correlação entre o aumento da sobrevivência das PL's com o aumento da dosagem ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$). No entanto, apesar do efeito positivo constatado, estes resultados devem ser considerados preliminares. Sendo assim, mais estudos devem ser realizados na tentativa de elucidar os mecanismos de ação destes compostos, os quais podem estar agindo tanto na ativação das respostas imunológicas, quanto no aumento da capacidade fisiológica de osmorregulação das PL's. Além disso, deve-se dar continuidade ao estudo, buscando otimizar o tempo e método de administração, assim como a dose ideal a ser empregada.

CONCLUSÃO

A administração, via imersão, por seis dias, dos polissacarídeos sulfatados das algas marinhas vermelhas *Champia feldmannii*, *Halymenia pseudoforesia* e *Gracilaria birdiae* ($4,0 \text{ mg.L}^{-1}$) não promoveram uma maior resistência às pós-larvas de camarão *Litopenaeus vannamei*, submetidas ao teste de estresse salino. Por outro lado, quando os polissacarídeos sulfatados de *Gracilaria birdie* foram administrados na concentração de $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ foi observado um aumento significativo na sobrevivência dos indivíduos, sugerindo um possível efeito protetor ao composto. O aparente efeito não se mostrou dose-dependente, não sendo observado um aumento significativo na sobrevivência média dos indivíduos, com a duplicação da dosagem empregada.

Agradecimentos - Ao CNPq, pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução do presente estudo. Ao laboratório de larvicultura de camarão marinho Aquacrusta Marinha Ltda, pertencente à fazenda de camarão Artemiza (Acará, Ceará), por terem gentilmente cedido os exemplares utilizados no experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barbieri, R.C.J. & Ostrensky, A.N. *Camarões marinhos - reprodução, maturação e larvicultura*. Aprenda Fácil, 255 p., Viçosa, 2001.
- Barracco, M.A.; Perazollo, L.M. & Rosa, R.D. *Imunologia de crustáceos com ênfase em camarões*. 80p. Disponível em: < <http://www.liaaq.ufsc.br/>>. Acesso em: 15 de dez. 2007.

- Barroso, F.E.C.; Rodrigues, J.A.G.; Torres, W.M.; Sampaio, A.H. & Farias, W.R.L. Effect of sulfated polysaccharides extracted from the red marine alga *Botryocladia occidentalis* in shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). *Rev. Ciên. Agron.*, Fortaleza, v.38, n.1, p.58-63, 2007
- Bauman, R.H. & Jamandre, D.R. A practical method for determining quality of *Penaeus monodon* (Fabricius) fry for stocking in grow-out ponds, p.124-131, in New, M.B.; Saram H. & Singh, T. (eds.), *Proceedings of the Aquatech Conference on Technical and Economic Aspects of Shrimp Farming*. INFOFISH, Kuala Lumpur, 1990.
- Beltrame, E. & Seiffert, W. Despesca e transporte de pós-larvas, p. 153-156, in *Curso Internacional sobre Produção de Pós-larva de Camarão Marinho*. Programa Iberoamericano de Ciência y Tecnologia para el Desarrollo, CYTEC, Florianópolis, 1997.
- Browdy, C. L. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. *Aquaculture*, v.164, p.3-21, 1998.
- Campa-Córdoba, A.I.; Hernández-Saavedra, N.Y.; Philippis, R. & Ascenio, F. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to beta-glucan and sulfated polysaccharide. *Fish Shell. Immunol.*, v.12, n.4, p.353-366, 2002.
- Dugger, D. Bio-modulation of the non-specific immune response in marine shrimp with beta-glucan. *Aquaculture Magazine*, v.25, p.81-86, 1999.
- 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 shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shell. Immunol.*, v.22, n.6, p.673-685, 2007.
- Guajardo, H.; Samocha, T.M.; Lawrence, A.L.; Speed, F.M.; Castille, F.L.; Page, K.I. & Mckee, D.A. Predictive criteria of shrimp larval quality: an experimental evaluation, p.242-245, in Hendry, C.I.; Van Stappen, G.; Wille, M. & Sorgeloos, P. (eds), *LARVI'01-Larviculture Symposium*. European Aquaculture Society, Spec. Publ. n°30, Oostende, 2001.
- Huang, X.; Zhou, H.Q & Zhang, H. The effect of *Sargassum fusiforme* polysaccharidae extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shell. Immunol.*, v.20, n.5, p.750-757, 2006.
- Lima, P.W.C. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha parda *Spatoglossum schroederi* sobre o aumento da resistência do camarão *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 99 p., Fortaleza, 2007.
- Olin, P.G. & Fast, A.W. Penaeid harvest, transport, acclimation and stocking, p. 301-320, in Fast, A.W. & Lestes, L.J. (eds.), *Marine shrimp culture: principles and practice*. Elsevier Science Publisher, 1992.
- Rodrigues, J.A.G. Atividade anticoagulante de galactanas sulfatadas de algas marinhas vermelhas do gênero *Halymenia* e seu efeito imunoestimulante no camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 77 p., Fortaleza, 2006.
- Santos, M. L. Programa de biossegurança para fazendas de camarão marinho. Recife: ABCC, Associação Brasileira de Criadores de Camarão, 2005. 61p. Disponível em: <[www.abccam.com.br/download/Manual De BiosseguranÇa.pdf](http://www.abccam.com.br/download/Manual%20De%20Biosseguran%C3%A7a.pdf)>. Acesso em: 23 de ago. 2007.
- Sung, H.H.; Kou, G.H. & Song, Y.L. Vibriosis resistance induced by glucan treatment in tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathol.*, v.29, n.1, p.11-17, 1994.
- Tackaert, W.; Abelin, P.; Leger, P. H. & Sorgeloos, P. Stress resistance as a criterion to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures, in *Anais do Simpósio Brasileiro sobre Cultivo de Camarão*, 3, João Pessoa, 1989.
- Torres, V.M. Efeito dos polissacarídeos sulfatados da alga marinha vermelha *Champia feldmannii* em camarão *Litopenaeus vannamei* submetido a situações de estresse. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, 90 p., Fortaleza, 2008.
- 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 Shell. Immunol.*, v.20, n.3, p.332-345, 2006.