

Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Juliana Righetto Moser

Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infeciosa - IHHNV

Florianópolis
2005



Universidade Federal de Santa Catarina
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Juliana Righetto Moser

Respostas bioquímicas do camarão-branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran e determinação da prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecçiosa - IHNV

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Maria Risoleta Freire Marques

Florianópolis
2005

Moser, Juliana Righetto

Avaliação das respostas bioquímicas ao estresse no camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) e sua relação com a prevalência natural do vírus IHHNV.

Juliana Righetto Moser. – Florianópolis, 2005.

75 f.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

1. *Litopenaeus vannamei*. 2. Biomarcadores. 3. IHHNV. I. Título.

À minha mãe, Eunice Righetto Moser, por me ensinar a ser forte e continuar sempre em frente.

AGRADECIMENTOS

À professora Dr^a. Maria Risoleta Freire Marques, minha orientadora e “little boss”, que se tornou um grande exemplo pra mim. Agradeço por ter me acolhido no laboratório, pela confiança depositada, por todo o conhecimento transmitido e pela oportunidade de continuarmos trabalhando juntas.

Ao professor Dr. Afonso Celso Dias Bainy, pelos conselhos, muitas vezes em cima da hora. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência e pelos muito e vitais momentos de descontração.

Ao professor Dr. Edemar Roberto Andreatta, pelo fornecimento dos animais e por permitir o desenvolvimento dos experimentos no LCM. Obrigada pela paciência e incentivo nestes últimos meses.

Ao Dr. Paulo Carvalho, que conseguiu o impossível, transformar a “Bat Carverna” em um local habitável.

Em especial, agradeço, a Karin “Maria”, minha amiga camaroneira, e à Taíse “Maria”, minha amiga conselheira. Obrigado por terem sido minhas companheiras de mestrado e de laboratório e por dividir comigo as ansiedades, dúvidas e alegrias. À Daniela “Maria”, Isabel “Maria” e Débora “Maria”, agradeço pelo fortalecimento da amizade, pelo apoio e troca de experiências e, principalmente, pelas boas gargalhadas.

Aos amigos da família LABICAI, além das “Marias” já citada, Igor, Jacó, Marília, Rafael, Daniel e Giuliana pelos momentos maravilhosos, pela ajuda nos experimentos e pela descontração. E os que já passaram pelo laboratório e cujas fotos continuam no nosso mural: Guilherme, Anna, Eliana, Priscilla, Juliano, Lucas e Jairo.

As minhas grandes amigas Angela, Fernanda e Graziela, companheiras pra toda hora. Obrigada por todo apoio e puxões de orelha, além das muitas festas que fizemos juntas.

Ao meu grande amor Ricardo, pela companhia “na alegria e na tristeza; na riqueza e na pobreza...”, nos experimentos até altas horas, pela paciência e incentivo. Obrigado por ser tão especial, pelo carinho e por estar sempre ao meu lado.

À minha mãe, Eunice, que mais torceu por essa tese e para vê-la pronta. A minha irmãzinha Ivana e ao Neto, pela grande ajuda na parte de informática e por dividir o computador comigo.

À todos os funcionários do LCM que auxiliaram durante a realização dos experimentos. À Daniela Maggioni por toda ajuda e pelos conhecimentos transmitidos. À Karina Medvedovsky, pela companhia e ajuda na realização dos experimentos e nas coletas.

Ao Diego Carvalho Sander, pela amizade e grande ajuda na realização dos experimentos e pelas análises físico-químicas.

À todos que contribuíram para a realização desta tese.

RESUMO

A importância e a influência dos fatores abióticos, das técnicas de manejo e da qualidade da água, principalmente quanto à contaminação pela presença de metais pesados, defensivos agrícolas e materiais em suspensão, têm sido reconhecidos em relação à sanidade dos cultivos. Assim, o estabelecimento de um conjunto de biomarcadores de estresse e de contaminação aquática poderia representar uma ferramenta fundamental para a sanidade dos cultivos, uma vez que o estresse pode ser associado a uma maior susceptibilidade a doenças. No presente estudo algumas respostas bioquímicas foram avaliadas em camarões marinhos (*Litopenaeus vannamei*) expostos ao inseticida Carbofuran (50 µg/L), em condições de laboratório. Após 48 horas de exposição, os animais expostos (n=5) e o grupo não-exposto (n=5) foram avaliados quanto as atividades das enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e de Glutathione-S-Transferase (GST), nas brânquias e hepatopâncreas. Na hemolinfa, foi avaliada a atividade das enzimas Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST), além da capacidade antioxidante do plasma. Os níveis da proteína de estresse, HSP 70, foram determinados nas brânquias e hepatopâncreas dos camarões expostos e não-expostos. A exposição ao Carbofuran promoveu uma tendência de inibição na AChE nas brânquias, não tendo sido observada nenhuma alteração no hepatopâncreas. A GST, nas brânquias e no hepatopâncreas, também não apresentou alterações nos seus níveis. As determinações plasmáticas da AST e da ALT, bem como a atividade antioxidante do plasma, não mostraram diferença estatística entre o grupo tratado e o não-tratado. Os níveis da HSP 70 detectados foram maiores no grupo expostos. A prevalência do vírus IHHNV foi, ainda, numa população (n=130) de indivíduos adultos, através da comparação de duas metodologias de diagnóstico, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a hibridização por *Dot Blot*. A prevalência do IHHNV, na população analisada, foi de 54,8% pela PCR, e 65,1% pelo *Dot Blot*. A importância da utilização de biomarcadores e de métodos diagnósticos de enfermidades virais no monitoramento dos cultivos é discutida.

ABSTRACT

The importance and the influence of abiotic factors, good farming practices and quality, especially due to the presence of trace-metals and pesticides, have been recognized in the sanity of cultivated organisms. Therefore, establishing proper biomarkers of stress and aquatic contamination may represent a fundamental tool for monitoring the sanity of cultivated organisms, since can be associated to a higher susceptibility to diseases. In the present study, some biochemical responses were evaluated in marine shrimps (*Litopenaeus vannamei*), exposed to Carbofuran (50 µg/L), under laboratory conditions. After 48 hours, the activity of the enzymes Acetylcholinesterase (AChE) and Glutathione-S-Transferase (GST) were determined in gills and hepatopancreas of exposed and non-exposed animals (n=5 for each group). The activity of the enzyme Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate Aminotransferase (AST) were measured in the hemolymph. The antioxidant capacity of the hemolymph was also evaluated. The levels of the 70 kDa heat-shock protein, HSP 70, were determined in gills and hepatopancreas of exposed and non-exposed shrimps. The exposure to Carbofuran promoted a slight tendency of inhibition in the activity of the enzyme AChE in gills. This was not observed in the hepatopancreas. No changes were seen in GST activity in gills. The activity of AST and ALT, as well as the antioxidant capacity in the plasma, showed no statistical difference between the exposed and non-exposed groups. The levels of HSP 70 were higher in the exposed group. The prevalence of the IHHNV was determined in a population (n=130) of adult shrimps, through two different molecular diagnostic methods, Polymerase Chain Reaction (PCR) and Dot Blot hybridization. The prevalence values of the virus in this population were 54.8%, using PCR, and 65.1%, using Dot Blot. The relevance of using biomarkers and diagnostic methods for viral diseases in the monitoring of cultivated shrimp is discussed.

SUMÁRIO

Resumo	vi
Abstract	vii
1. Introdução	1
Panorama da Carcinicultura	1
Vírus da Necrose Hipodermal Hematopoiética Infecciosa – IHHNV	4
Métodos para o diagnóstico de enfermidades virais em cultivos	5
Qualidade da água e fatores ambientais	7
Avaliação das respostas ao estresse através do uso de biomarcadores	9
Capítulo 1 – Respostas bioquímicas do camarão branco, <i>Litopenaeus vannamei</i> (BOONE, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran.	
1. Introdução	14
2. Objetivos	19
3. Materiais e Métodos	20
3.2. Delineamento do experimento	20
3.2.1. Aclimação	20
3.2.2. Exposição	20
3.3. Coleta e preparação das amostras	21
3.4. Determinação de proteínas totais	21
3.5. Avaliação da capacidade antioxidante	22
3.6. Expressão da proteína de estresse HSP 70	22
3.7. Dosagens enzimáticas	22
5. Resultados	24
5.1. Observação e coleta do animais expostos ao Carbofuran	24
5.2. Biometria dos animais	24
5.3. Concentração de proteínas totais	24
5.4. Capacidade antioxidante do plasma	24
5.5. Expressão da proteína de estresse HSP 70	25
5.6. Dosagens enzimáticas	25
6. Discussão	29
Capítulo 2 – Prevalência natural do IHHNV em uma população de camarões marinhos cultivados, <i>Litopenaeus vannamei</i> .	
1. Introdução	37
2. Objetivos	42
3. Materiais e Métodos	43
3.1. Material biológico	43
3.2. Aclimação	43
3.3. Coleta das amostras	43
3.4. Detecção do IHHNV	43
3.4.1. Extração do material genômico	43
3.4.2. Eletroforese em gel de agarose	44
3.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase	44
3.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)	45
3.4.5. <i>Dot Blot</i>	45
4. Resultados	47
5. Discussão	50
Considerações finais	55
Referências	58

Panorama da Carcinicultura

Atualmente, a aqüicultura é o setor de produção de alimentos que mais cresce no mundo. Ao contrário do que ocorre com a pesca de captura, a produção da aqüicultura segue crescendo sensivelmente. Segundo estatísticas da FAO (2004), a contribuição da aqüicultura na produção mundial de peixes, crustáceos e moluscos passou de 3,9% da produção total em toneladas em 1970, para 27,3% em 2000.

Entre os diversos segmentos da aqüicultura, o cultivo de camarão - a carcinicultura - é o que mais tem se desenvolvido desde seu início, a mais de três décadas (NASCIMENTO, 2000). O cultivo de camarão marinho, como atividade produtiva do setor primário da economia, tem reflexos imediatos no mercado de trabalho pela sua ampla capacidade de gerar empregos diretos e indiretos. A experiência dos principais países produtores é reveladora do impacto e da importância sócio-econômica do camarão cultivado nas suas respectivas áreas de influência (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001).

Da produção mundial de camarões cultivados, 75% tem origem nos países asiáticos, destacando-se a entre eles, Tailândia, Indonésia, China, Vietnã e Índia. Os 25% restantes correspondem ao continente americano, sobressaindo-se o Equador, seguido pelo Panamá, Colômbia e México, segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2001). Até 2001, o Brasil ocupava o 14º lugar entre os maiores produtores do mundo e o 6º entre os países americanos. Dois anos depois, a carcinicultura marinha brasileira já ocupava a 7ª posição do ranking mundial dos produtores de camarão cultivado, destacando-se pelos altos índices de desempenho técnico, econômico e social, ocupando a liderança mundial em termos de produtividade (ROCHA, 2005).

A carcinicultura marinha encontra na faixa costeira brasileira parâmetros ecológicos ideais para a sua exploração. O Brasil é um país privilegiado neste aspecto, devido não só a riqueza de seus recursos aquáticos, mas também pela extensão da linha costeira, com mais de 8.000 km, apropriada para a aqüicultura. Assim, a carcinicultura marinha vem sendo desenvolvida de forma bastante viável e sustentável no país, na região nordeste, além das

regiões sudeste e sul (ROUBACH et al., 2003).

A carcinicultura brasileira foi iniciada na década de 60. Entretanto, a prática do cultivo de camarão em termos empresariais somente teve início nos anos 80, com o uso da espécie exótica *Marsupenaeus japonicus*. Em meados desta mesma década, ressentindo-se de pesquisas na área e ante a inaptidão do *M. japonicus* às altas salinidades, os objetivos da carcinicultura brasileira foram redirecionados para as espécies nativas *Farfantepenaeus subtilis*, *Litopenaeus schmitti*, *Farfantepenaeus brasiliensis* e *Farfantepenaeus paulensis* (MACIEL, 2002; ANDREATTA comunicação pessoal). No entanto, a baixa produtividade dessas espécies provocou a desativação de várias fazendas. No início dos anos 90, a espécie *Litopenaeus vannamei* foi introduzida nos cultivos do país. Espécie exótica, sua capacidade de adaptação às mais variadas condições locais de cultivo contribuiu para elevá-la à principal espécie da carcinicultura brasileira (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2001). Esta espécie habita locais na faixa de 0 a 72 m de profundidade, distribuindo-se desde o leste do Pacífico, no norte do México, até Tumbes, na região do Peru (PÉREZ FARFANTE; KENSLEY, 1997; NUNES, 2001).

Em Santa Catarina, a carcinicultura teve início na década de 60 e foi retomada em 1983. No segundo semestre de 1998, a Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural do Estado de Santa Catarina (EPAGRI) foram responsáveis pela introdução da espécie *Litopenaeus vannamei* nas fazendas existentes no Estado. Os excelentes resultados obtidos com *L. vannamei* motivaram a elaboração do Programa Estadual de Cultivo de Camarões Marinhos, lançado no município de Laguna, em maio de 1999 (SEIFFERT et al., 2000). O litoral catarinense apresenta inúmeras áreas propícias à implantação de fazendas de camarões, destacando-se as regiões do complexo Lagunar Sul (Laguna, Jaguaruna, Imbituba e Imaruí), Grande Florianópolis (Paulo Lopes, Biguaçu, Tijucas) e Baía da Babitonga (São Francisco do Sul, Araquari e Barra do Sul), áreas desprovidas de vegetação de mata atlântica, arenosas e não competitivas para pecuária (COSTA et al., 1999).

Em 2001, a produção de *L. vannamei* em Santa Catarina foi de 572,1 toneladas (SOUZA, 2001), relativas a 270 ha de tanques distribuídos em 23 fazendas. Esta produção superou em 200% a produção do ano anterior (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001).

Em 2003, o Brasil produziu 90 mil toneladas de camarão. Apesar da queda na produção (80 mil toneladas), registrada em 2004, a projeção para 2005 é que sejam produzidos 105 mil toneladas. Em contrapartida, as exportações brasileiras para a Europa, principalmente França e Espanha, passaram de 34.903 toneladas em 2003 para 40.481, em 2004 (MERCADO DA PESCA, 2005).

O cultivo da espécie *Litopenaeus vannamei*, cuja tecnologia de reprodução e engorda já está, em grande parte consolidada, tem contribuído de modo significativo para o desenvolvimento da carcinicultura marinha brasileira. A produção de pós-larvas, graças ao esforço concentrado da iniciativa privada, já alcançou a auto-suficiência. As rações balanceadas disponíveis no Brasil, apesar de ainda deixarem algum espaço para melhoria de qualidade e maior competitividade, vêm contribuindo para a obtenção de altos níveis de produtividade dos viveiros (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001). O grande potencial reprodutivo, a curta duração dos ciclos de cultivo e os altos preços do produto no mercado mundial constituem aspectos positivos para o investimento nesta atividade. Entretanto, segundo Andreatta e Beltrame (2004), apesar dos números positivos, a produção de camarão tem se caracterizado como negócio de alto risco.

Apesar dos resultados otimistas, parece haver atualmente, em escala mundial, uma desaceleração na expansão das áreas de cultivo e no volume da produção aquícola. Esta situação é atribuída principalmente à degradação do meio ambiente, ao manejo inadequado das condições de cultivo e às perdas na produção, ocasionadas por enfermidades (ROCH, 1999; HERNANDÉZ, 2000).

As enfermidades em camarões peneídeos cultivados incluem síndromes com etiologias infecciosas e não infecciosas. As enfermidades infecciosas são causadas por

patógenos transmissíveis, como por exemplo, vírus, bactérias, fungos e protistas, enquanto que, as não infecciosas, são resultantes de agentes abióticos como efeitos nutricionais, genéticos, ambientais e físicos (LIGHTNER, 1996; LIGHTNER; REDMAN, 2000; BROCK; LIGHTNER, 1990).

Nos últimos anos, a incidência de enfermidades virais na carcinicultura marinha tem se agravado. Apesar de inofensivas aos seres humanos, as infecções virulentas no cultivo de camarões freqüentemente acarretam mortalidades elevadas, levando, muitas vezes, a uma completa perda na produção (BROWDY; BRATVOLD, 1998; MACIEL, 2002).

De acordo com Lightner e Redman (1998), mais de vinte vírus podem infectar os peneídeos, entre eles o vírus da mancha branca (*White Spot Syndrome Virus - WSSV*), o vírus da cabeça amarela (*Yellow Head Virus - YHV*) e o vírus da necrose hipodermal hematopoiética infecciosa (*Infectious Hypodermal Hematopoietic Necrosis Virus - IHHNV*), os quais representam importantes agentes patogênicos para a Ásia e a região do Indo-Pacífico. Nas Américas, os principais agentes estão representados pelos vírus IHHNV e, ainda, pelo vírus da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus - TSV*). Mais recentemente, em 2004, um novo agente viral, o vírus da Necrose Infecciosa Muscular (*Infectious Myonecrosis Virus - IMNV*), foi descrito, a partir do estudo e da caracterização de lesões musculares em espécimes de *Litopenaeus vannamei*, oriundos de cultivos do Piauí, Brasil (LIGHTNER et al., 2004). O intervalo entre o aparecimento da doença (setembro de 2002) e a confirmação de sua etiologia (fevereiro de 2004), causou sérios prejuízos a carcinicultura brasileira. Em 2003, a perda na produção dos cultivos de *Litopenaeus vannamei* foi estimada em aproximadamente 20 milhões de dólares americanos, um impacto inesperado para o setor (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).

Vírus da Necrose Hipodermal Hematopoiética Infecciosa – IHHNV

O vírus da Necrose Hipodermal Hematopoiética Infecciosa - IHHNV - é classificado como parvovírus, contendo DNA fita simples. Este vírus infecta diferentes espécies de camarões peneídeos, porém não parece infectar outros tipos de crustáceos decápodes

(LAMELA et al., 2004). Ele infecta tanto camarões cultivados, como *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus stylirostris*, bem como algumas populações selvagens (MOTTE et al., 2003). O IHNV está listado entre os vírus causadores de epizootias, considerados de notificação obrigatória pela Organização Internacional de Epizootias - OIE (OIE, 2004).

Este vírus foi inicialmente observado em 1980 no Havaí, em populações cultivadas de *L. stylirostris*. Apesar do IHNV ser altamente patogênico para esta espécie, o mesmo não foi observado para *L. vannamei*. Entretanto, a infecção em *L. vannamei* é caracterizada por induzir alterações no crescimento e desenvolvimento dos animais, causando perdas econômicas entre 10 e 50% (LIGHTNER; REDMAN, 1998). Como sinais clínicos, os animais infectados apresentam deformidades no rostrum, flagelo antenal enrugado, deformidades cuticulares e taxa de crescimento reduzida. Na espécie *L. vannamei* essa infecção pode se manifestar através de animais nanicos, com deformidades ao longo do corpo (*Runt Deformity Syndrome* – RDS).

A transmissão do IHNV pode ser vertical, durante o desenvolvimento embrionário, ou horizontal, através da ingestão de tecido infectado e contato com água ou equipamentos contaminados (NUNES; MARTINS, 2002).

Infecções com baixa virulência, como é o caso do IHNV, são pouco investigadas e praticamente aceitas pelos produtores, o que, segundo Motte et al. (2003), pode contribuir para elevar sua prevalência e gerar perdas repentinas na produtividade.

Métodos para o diagnóstico de enfermidades virais em cultivos

Os métodos utilizados para determinar a etiologia de enfermidades em camarões peneídeos diferem pouco daqueles utilizados em peixes ou, de modo geral, em patologias de origem veterinária ou humana. Na realidade, todas as técnicas empregadas para diagnóstico de enfermidades em crustáceos foram adaptadas de outras áreas da patologia (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Apesar da crescente necessidade o uso de métodos práticos e confiáveis para a análise rápida do estado de saúde de camarões cultivados ainda permanece limitado. Problemas de saúde são geralmente detectados em estágios avançados do sistema de cultivo, por reduções no crescimento, alterações no comportamento e até mesmo mortalidade generalizada (MARQUES; BARRACCO, 2000; PERAZZOLO et al., 2002). Em muitos casos, a necropsia *post mortem* e a histologia constituem métodos de diagnóstico primário, porém, perdem seu objetivo quando o patógeno encontra-se em quantidades não detectáveis ou quando não se manifestam sinais clínicos da enfermidade (FAO, 2000).

De maneira geral, o diagnóstico de patógenos em cultivos de camarões incluem os métodos tradicionais de histopatologia, microbiologia, microscopia direta e microscopia eletrônica, bioensaio e a aplicação de métodos sorológicos. Por outro lado, a necessidade crescente de respostas rápidas e alta sensibilidade na detecção de patógenos, conduziram a biotecnologia para o estudo de enfermidades em camarões peneídeos. Métodos de detecção baseados em ácidos nucleicos têm sido descritos na literatura e algumas destas metodologias já estão, inclusive, disponíveis comercialmente (LIGHTNER; REDMAN, 1998; FAO, 2000).

Tecnologias baseadas em ácidos nucleicos, como aquelas envolvendo a hibridização com sondas específicas marcadas e a amplificação de seqüências genômicas específicas pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), têm confirmado seu potencial para a identificação de vários tipos de patógenos, em organismos aquáticos, particularmente em peneídeos. A principal vantagem deste tipo de tecnologia é a rapidez, principalmente quando comparada com métodos baseados em cultura *in vitro*. Este fator é particularmente importante para o diagnóstico de agentes etiológicos que não podem ser propagados *in vitro* ou frente a ausência de linhagens celulares estabelecidas, como é o caso de moluscos e camarões (ROCH, 1999). Hoje, as análises por métodos de hibridização e PCR proporcionam maior sensibilidade de detecção de alguns vírus de peneídeos, como por exemplo, para o IHNV (LIGHTNER et al., 1992, 1994) e vêm sendo empregadas de modo

rotineiro em exames laboratoriais com finalidade de diagnóstico, em processos de certificação e, ainda, em levantamentos de quarentena (LAMELA; COFFIGNY; MARTÍNEZ, 2004).

Cabe salientar que o conhecimento relativo às enfermidades de animais aquáticos ainda é limitado e a sensibilidade dos diferentes métodos diagnósticos não foi ainda suficientemente estudada. Além disso, a capacidade de erradicação das enfermidades não foi estabelecida de forma eficaz, uma vez tenham sido as mesmas introduzidas em áreas de cultivo (ROCH, 1999; BACHÈRE, 2000). Desta forma, a investigação e a implementação de procedimentos para diagnosticar o estado de saúde dos camarões cultivados de forma sistemática, poderia contribuir para permitir a detecção precoce de problemas existentes nos cultivos, possibilitando ações para controlar, minimizar ou excluir os efeitos negativos sobre a produção (NUNES; MARTINS, 2002).

Qualidade da água e fatores ambientais

A saúde dos camarões e, conseqüentemente, a produtividade de uma fazenda de cultivo são fortemente influenciadas pelas condições físicas, químicas e biológicas que prevalecem ao longo do processo de cultivo. Mais especificamente, qualquer elemento presente na água que afete a sobrevivência, a reprodução, o crescimento, a produção ou o manejo da população cultivada de camarões é uma variável importante na qualidade da água (BOYD, 1979). De acordo com Snieszko (1973), a expressão da enfermidade como processo mórbido é o resultado de uma completa interação entre o agente patogênico, o hospedeiro e o ambiente. Contudo, em relação a crustáceos marinhos, existe uma escassez de dados que suportem a hipótese, segundo a qual mudanças ambientais induzem alterações do sistema imune, levando a uma maior susceptibilidade a agentes infecciosos (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

Animais em sistemas de cultivo apresentam maior contato entre si e restrição de movimento, estando sujeitos, muitas vezes, a baixa qualidade da água, mudanças repentinas das condições em que estão submetidos, além daquelas relacionadas à

manipulação e transporte. Tais fatores promovem o estresse dos animais podendo favorecer a ação de agentes patogênicos (BACHÈRE, 2000).

Inúmeros fatores ambientais podem agir como agentes estressores e propiciar ou desencadear um processo infeccioso nos camarões marinhos. Temperatura e pH extremos, baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mudanças abruptas na salinidade e presença de substâncias tóxicas endógenas ou xenobióticos, são exemplos de tais fatores (NUNES; MARTINS, 2002; PERAZZOLO et al., 2002). Na Tabela 1 estão apresentados os valores recomendáveis para os principais parâmetros de qualidade da água para o cultivo de *Litopenaeus vannamei*, segundo o Manual Purina de Bioseguridade no cultivo de camarões marinhos (HERNANDÉZ, 2000) e a Cartilha de Boas Práticas de Manejo na Fazenda para Prevenir e Controlar Enfermidades do Camarão *L. vannamei* no Brasil (FONSECA; ROCHA, 2004).

Tabela 1 - Valores recomendáveis para os principais parâmetros de qualidade da água para o cultivo de *Litopenaeus vannamei*. Adaptado de Hernández (2000) e Fonseca e Rocha (2004).

Parâmetros	Valores recomendáveis
Amônia total	0,1 – 1,0 mg/L
Amônia não – ionizada	< 0,1 mg/L
Nitrogênio total inorgânico	0.5 – 2.0 mg/L
Alcalinidade	80 – 140 mg/L CaCO ₃
pH	7,0 – 9,0
Oxigênio dissolvido	5,0 – 10,0 mg/L
Dióxido de carbono	< 20 mg/L
Temperatura	25 – 32 °C
Transparência	35 – 50 cm
Salinidade	15 – 25 ppm
Clorofila a	50 – 75 mcg

A utilização de pesticidas em plantações é outro problema que pode afetar a saúde animal. Resíduos de pesticidas são freqüentemente encontrados nos ecossistemas costeiros, podendo vir a contaminar as águas, após lixiviação. Muitas vezes, áreas adjacentes aos cultivos de camarão são ocupadas por plantações, o que pode comprometer a qualidade da água dos plantéis. Segundo Galindo-Reyes et al. (2000), estudos têm

demonstrado que concentrações subletais destes pesticidas, como por exemplo, DDT, Lindane e Diazinon, causam alterações fisiológicas e bioquímicas em camarões expostos, o que por sua vez, afeta a produtividade dos cultivos.

A relação entre as mudanças ambientais ou a contaminação da região costeira com a ocorrência de doenças em peixes e moluscos tem encontrado evidência experimental considerável nos últimos anos (ROCH, 1999). No entanto, relativamente poucas investigações têm sido realizadas visando estabelecer a correlação entre os diferentes parâmetros de manutenção dos cultivos, o grau de estresse dos animais e a susceptibilidade a infecções virais em crustáceos marinhos (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

Avaliação das respostas ao estresse através do uso de biomarcadores

Talvez uma das maiores dificuldades para se compreender a correlação entre o manejo dos cultivos, o estresse dos animais e a susceptibilidade a infecções virais esteja relacionada à definição e/ou caracterização do conjunto de respostas comportamentais, fisiológicas e moleculares, a ser utilizado neste tipo de estudo. Alterações bioquímicas, fisiológicas e aquelas associadas a parâmetros hemato-imunológicos na hemolinfa parecem apresentar um bom potencial como ferramentas para a avaliação da resposta ao estresse e devem ser melhor investigadas, como sugerido por Bachère (2000), Le Moullac e Haffner (2000) e Marques e Barracco (2000).

Contaminantes orgânicos podem causar, além de outras alterações, a indução de enzimas que atuam na metabolização ou detoxificação dos mesmos, ou, em alguns casos, produzir metabólitos ativos. Durante o processo de biotransformação, outras alterações envolvem a indução de enzimas decorrente de interações destes contaminantes com receptores celulares e, ainda alterações no DNA. Estas respostas podem não causar nenhum dano evidente ao organismo, porém podem trazer conseqüências para as células ou para todo o organismo, afetando, por exemplo, seu crescimento e reprodução. Neste sentido, as alterações bioquímicas são a primeira resposta de ação biológica e representam

a base molecular da toxicidade (WALKER et al., 1996).

Biomarcadores fisiológicos específicos e não específicos têm a capacidade de integrar os efeitos de estresses múltiplos e podem ajudar a elucidar os mecanismos moleculares desses efeitos (modo de ação) (HUGGETT et al., 1992). Dentro deste contexto, a utilização de biomarcadores para monitorar o estresse em espécimes de *Litopenaeus vannamei*, em condições de laboratório, é relevante, dada a escassez de literatura envolvendo o estudo de biomarcadores para esta espécie.

Os biomarcadores têm como vantagem promover um alerta inicial e precoce de danos biológicos. Biomarcadores são classificados como biomarcadores de exposição e biomarcadores de efeito. Os de exposição são aqueles que indicam exposição dos organismos aos contaminantes, mas não dão informação do grau de efeito adverso que esta alteração causou. Os de efeito ou efeito tóxico são aqueles que demonstram um efeito adverso no organismo (WALKER et al., 1996). Os efeitos dos contaminantes químicos podem ocorrer em diferentes níveis de organização biológica, estendendo-se desde o molecular ou bioquímico, a fisiologia integrada do indivíduo até os níveis de população e de ecossistema.

A exposição a poluentes pode ser observada pela análise de sistemas enzimáticos envolvidos em processos de biotransformação de xenobióticos. Neste caso, a atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST) vem sendo utilizada como biomarcador. Esta enzima catalisa reações de conjugação de uma grande variedade de xenobióticos, além de compostos endógenos, com o tripeptídeo glutathione (GSH). Este mecanismo bioquímico de defesa promove a hidrossolubilidade destes compostos, facilitando a sua excreção (FITZPATRICK et al., 1997).

Outro biomarcador utilizado é a inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável por hidrolisar a acetilcolina em colina e ácido acético durante o processo de neurotransmissão (HUGGETT et al., 1992). A inibição da AChE ocorre na presença de compostos organofosforados e carbamatos e está diretamente ligada com o mecanismo de ação tóxica (ligação irreversível ou reversível de sítios esterásicos e potenciação de efeitos

colinérgicos).

A alanina aminotransferase (ALT) é uma enzima encontrada predominantemente no fígado e, em concentração moderada, nos rins de mamíferos. A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima encontrada em concentração muito alta no músculo cardíaco e no fígado, também em mamíferos. A ocorrência de uma lesão tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença que afete o parênquima hepático (ou uma lesão tecidual nos rins, coração ou nos músculos esqueléticos) acarreta a liberação de uma maior quantidade destas enzimas para a corrente sanguínea, elevando, conseqüentemente, os seus níveis séricos. Estas enzimas têm sido bastante estudadas em mamíferos, em particular em humanos, poucos trabalhos têm sido realizados utilizando estas enzimas para invertebrados. Em crustáceos, apenas estudos mais recentes sobre os efeitos de pesticidas (GALINDO-REYES et al., 2000) e estresse termal e osmótico (CHIEN; PAN; HUNTER, 2003), utilizaram a atividade destas enzimas.

A capacidade antioxidante do plasma também tem sido proposta como biomarcador de exposição a compostos indutores de estresse oxidativo. O plasma possui proteínas protetoras específicas, como transferrina e ceruloplasmina, que se ligam ao ferro e ao cobre, respectivamente, prevenindo a ação catalítica destes íons na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, o plasma contém moléculas redox ativas, de baixo peso molecular, algumas das quais atuam como antioxidantes primários (GUTTERIDG; QUINLAN, 1993; HOLMBLAD; SODERHALL, 1999).

Outra abordagem inclui as proteínas de choque térmico – *Heat Shock Proteins* (HSP) – ou proteínas de estresse, como um instrumento válido para o biomonitoramento de exposições a contaminantes, na tentativa de prevenir conseqüências biológicas que possam vir a afetar o organismo ou níveis de organização superiores. As HSP têm a função de manter a conformação das proteínas celulares, agindo como chaperonas. Além do choque térmico, uma variedade de outros agentes estressores pode induzir a síntese destas proteínas, inclusive salinidade (GONZALES; BRADLEY, 1995) e agentes tóxicos (LINDQUIST; CRAIG, 1988). As proteínas de estresse têm sido identificadas em todos os

organismos estudados até o presente, sendo o mais conservado sistema genético conhecido (LINDQUIST; CRAIG, 1988; CIMINO et al., 2002). A exposição das células a agentes estressores resulta em um conjunto de rápidas alterações metabólicas, referidas como respostas ao estresse. Tais alterações incluem a ativação e elevação da expressão de um pequeno conjunto de genes, resultando num aumento da síntese e acumulação de proteínas de estresse (NASCIMENTO et al., 1998).

Simultaneamente aos estudos de biomarcadores, estudos genéticos concentram-se na espécie *Litopenaeus vannamei*, motivados, sobretudo, pelo avanço do cultivo de camarões na costa brasileira. Os estudos de melhoramento genético desta espécie de camarão no Brasil, assim como ocorreu em outros países produtores de camarão, estão sendo iniciados tanto pela iniciativa privada quanto pelo setor público. Paralelamente, o seqüenciamento do genoma do camarão *Litopenaeus vannamei*, no sentido de identificar genes de interesse para o cultivo comercial, está sendo desenvolvido por uma rede de quatorze laboratórios em oito Estados brasileiros. Dentro do prazo de três anos, é esperado o mapeamento dos genes relacionados ao crescimento e à resistência da espécie a doenças, de forma a melhorar a produção de camarão no Brasil (ShEST, 2003). A identificação de seqüências expressas pode discriminar linhagens e indivíduos, podendo vir a auxiliar o monitoramento de estoques e o desenvolvimento de programas de melhoramento genético para esta espécie de peneídeo (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2001).

O presente trabalho representa uma etapa inicial de um estudo mais abrangente, que visa utilizar as respostas de alguns biomarcadores como ferramentas na avaliação da influência de parâmetros ambientais sobre a susceptibilidade a doenças, combinando a questão ambiental com a sanidade dos cultivos. As informações aqui apresentadas estão reunidas em capítulos, sendo o primeiro referente à contaminação da água dos plantéis pelo pesticida Carbofuran, oriundo de áreas adjacentes aos cultivos, comumente utilizadas para agricultura. O segundo capítulo refere-se à padronização e comparação de duas metodologias para determinação da prevalência do vírus IHHNV.

Capítulo 1

Respostas bioquímicas do camarão branco, *Litopenaeus vannamei*
(BOONE, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran.

1. Introdução

A carcinicultura encontra, na costa brasileira, condições favoráveis para o seu desenvolvimento, representando uma importante atividade econômica para a população litorânea. A faixa costeira do Brasil abriga grande parte da indústria nacional de camarão, além de centros de processamento do produto para o mercado e laboratórios de larvicultura (MERCADO DA PESCA, 2003).

Os cultivos, cada vez mais concentrados nas regiões costeiras, estão sujeitos ao impacto causado por diversas atividades de origem antropogênica, podendo, potencialmente, receber resíduos provenientes destas atividades. Assim, inúmeros problemas presentes nos cultivos, incluindo baixo crescimento, estresse e ocorrência de enfermidades, têm sido associados a esta situação (ROCH, 1999). O estresse ambiental provocado por contaminantes parece ser um fator determinante na redução da imunocompetência dos animais, sinalizada pelo aparecimento ou aumento da prevalência de enfermidades (LE MOULLAC; HAFFNER, 2000).

Um dos problemas que podem afetar a saúde animal é a utilização de pesticidas em plantações. Resíduos de pesticidas são frequentemente encontrados nos ecossistemas costeiros, podendo vir a contaminar as águas após lixiviação. Muitas vezes as áreas adjacentes aos cultivos de camarão são ocupadas por plantações, sendo comum a detecção, na água que chega ao cultivo, de resíduos dos pesticidas oriundos das mesmas, o que acaba comprometendo a qualidade da água dos plantéis (GALINDO-REYES et al., 2000).

Em Santa Catarina, algumas das áreas ocupadas com cultivos de camarão encontram-se próximas a estuários e lagoas costeiras e utilizam a mesma água que recebe a drenagem de áreas de rizicultura. Os solos cultivados com arroz ocupam cerca de 7% da área total do Estado, localizando-se, principalmente, nas planícies litorâneas (90% das áreas de várzeas); na parte sul, estendendo-se da divisa com o Rio Grande do Sul até o Cabo de Santa Marta, e ao norte, na Baía de Babitonga e região das cidades de Joinville e

Itajaí. Os 10% restantes são encontrados no planalto de Canoinhas (EMBRAPA, 2004). Com isso, resíduos químicos, provenientes do cultivo do arroz, podem representar uma ameaça para a carcinicultura catarinense.

A legislação vigente, através do artigo 8º da Resolução CONAMA nº20/86, estabelece para as águas de Classe Cinco, salgadas, teores máximos de substâncias consideradas potencialmente prejudiciais, entre elas os inseticidas carbamatos. Porém, faltam informações a respeito do potencial efeito desta classe de compostos sobre as espécies animais cultivadas.

Respostas comportamentais e moleculares, no âmbito bioquímico e imunológico, podem ser utilizadas para monitorar o estado de saúde dos animais nos cultivos. Alterações bioquímicas, fisiológicas e aquelas associadas a parâmetros hemato-imunológicos na hemolinfa parecem apresentar um bom potencial como ferramentas para a avaliação da resposta ao estresse e devem ser melhor investigadas, como sugerido por Bachère (2000) e Le Moullac e Haffner (2000). Segundo Galindo-Reyes et al. (2000), estudos têm demonstrado que concentrações subletais destes pesticidas causam alterações fisiológicas e bioquímicas em camarões expostos, o que por sua vez, afeta a produtividade dos cultivos. Os efeitos tóxicos e a concentração letal de pesticidas organoclorados (LC₅₀) em *Litopenaeus vannamei* juvenis foram determinadas por Galindo-Reyes, Jasso e Lizarraga (1996a). Larvas de camarões desta espécie de peneídeo, expostas à pesticidas organoclorados, mostraram alterações drásticas no metabolismo, o que afetou diretamente o seu crescimento (GALINDO-REYES; JASSO; LIZARRAGA, 1996b). Lesões epiteliais no hepatopâncreas de pós-larvas de *L. vannamei* foram observadas, após exposição crônica ao inseticida carbamato benomil (LIGHTNER et al. 1996). Alterações no comportamento de *Metapenaeus ensis* juvenis também foram observadas, após a exposição a inseticidas organofosforados Diazinon, Malathion e Paraquat (CHU; LAU, 1994).

De maneira geral, poucos trabalhos têm sido conduzidos com biomarcadores, em camarões peneídeos, visando relacionar as condições de estresse com as condições

ambientais dos cultivos (BAINY, 2000; MARQUES; BARRACCO, 2000).

Os inseticidas, quando absorvidos pelos organismos, causam reações neurotóxicas, capazes de provocar efeitos adversos no sistema nervoso central, em nervos periféricos e órgãos do sentido. Estes efeitos são considerados reversíveis quando ocorrem mudanças funcionais temporárias e, irreversíveis, quando envolvem mudanças estruturais com degeneração das células nervosas (LARINI, 1997). Inseticidas organofosforados, carbamatos e piretróides, quando absorvidos pelos organismos, são metabolizados e excretados rapidamente, sem permitir a ocorrência da acumulação nos tecidos vegetais e animais (LU, 1996; LARINI, 1997).

O Carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetilbenzofurano-7-il metilcarbamato), cuja fórmula molecular pode ser representada por $C_{12}H_{15}NO_3$, é um inseticida pertencente ao grupo dos carbamatos, comumente utilizado na rizicultura (STEPHENSON; CHOI; OLMOS-JERVZ, 1984) e que possui um amplo espectro de ação, pois apresenta propriedades inseticidas, acaricidas e nematocidas. No Brasil, o Carbofuran é comercialmente encontrado pelo nome de Furadan, Carboran e Ralzer, vendidos em diferentes formulações. O Carbofuran apresenta alta toxicidade para peixes e, menor toxicidade para moluscos e crustáceos marinhos (KENNISH, 1996). O Carbofuran liga-se reversivelmente à enzima acetilcolinesterase, inibindo a ação desta sobre a acetilcolina. A acetilcolina é uma substância neurotransmissora liberada no interior das junções das células nervosas, provocando a propagação do impulso nervoso de uma célula para outra. Para que ocorra a transmissão de um novo impulso nervoso, a acetilcolina é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase existente na junção. Esta catálise enzimática ocorre devido à especificidade estrutural do substrato de ligação da enzima que a acetilcolina apresenta (LEHNINGER, 1991). Devido às semelhanças na estrutura molecular com o substrato de ligação (acetilcolina), o Carbofuran atua como um inibidor competitivo da enzima.

Um biomarcador amplamente utilizado no monitoramento de contaminações envolvendo inseticidas é a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) (STEGEMAN et al,

1992; BAINY, 2000). A inibição da AChE determina o acúmulo de acetilcolina. Em invertebrados artrópodes, como crustáceos e insetos, a acumulação da acetilcolina induz um típico padrão de intoxicação que inclui convulsões e paralisia (LUND; FULTON; KEY, 2000). Os sinais e sintomas da intoxicação podem ser aparentes ou não, sendo diretamente proporcionais ao nível de inibição da atividade da enzima, entre eles: depressão geral de comportamento e das funções sensitivas, diminuição do peso corporal, hipotermia, transmissão contínua e desordenada de impulsos nervosos e desregulação de outros processos autônomos. Entretanto, o quadro sintomatológico varia em função da magnitude de exposição ao composto tóxico e, entre diferentes espécies (LARINI, 1997).

Além da AChE, outras análises enzimáticas também são indicadas para o monitoramento das condições ambientais e de saúde dos animais. A enzima glutathione-S-transferase (GST) catalisa reações de conjugação de uma grande variedade de xenobióticos com o tripeptídeo glutathione (GSH) (LIVINGSTONE, 1991). Este mecanismo bioquímico de defesa serve para aumentar a hidrossolubilidade destes compostos e, dessa forma, facilitar a sua excreção, diminuindo seus efeitos sobre os organismos. Outras duas enzimas, a alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST), podem indicar lesão tissular ou hepatocelular de qualquer etiologia ou doença afetando o parênquima hepático dos animais, o que se reflete na elevação dos níveis séricos das mesmas. Estas enzimas têm sido utilizadas para monitorar a exposição a drogas hepatotóxicas e contaminantes, em vertebrados, como peixes e mamíferos (SPARLING et al., 1998; ALVES, 2003).

A capacidade antioxidante do plasma também tem sido proposta como biomarcador de exposição a compostos indutores de estresse oxidativo. O plasma possui proteínas protetoras específicas para combater a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), além de moléculas que podem atuar como antioxidantes primários (GUTTERIDGE; QUINLAN, 1993). Outra abordagem, dentro do conjunto de biomarcadores moleculares, envolve a avaliação dos níveis das proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein* - HSP), as quais têm a função de manter a conformação nativa das proteínas celulares, sendo induzidas por choque térmico e uma variedade de outros estressores, inclusive agentes

tóxicos, incluindo anóxia, metais pesados e xenobióticos (LINDQUIST; CRAIG, 1988; KUHNNEN, 2001; CIMINO et al., 2002).

O uso intensivo de inseticidas em regiões próximas aos cultivos de camarão pode levar a perdas massivas na produção. Nos casos onde os produtores utilizam ferramentas para diagnosticar o estado de saúde dos organismos, estas perdas podem ser evitadas (BAINY, 2000; MARQUES; BARRACCO, 2000).

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar algumas respostas bioquímicas do camarão *Litopenaeus vannamei*, exposto a um inseticida carbamato, através da utilização de biomarcadores, visando sua aplicação, no monitoramento do estado de saúde de camarões peneídeos cultivados.

2. Objetivo Geral

- Avaliar respostas bioquímicas do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931), exposto ao inseticida Carbofuran, em condições de laboratório.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante da hemolinfa de espécimes de *L. vannamei* expostos ao xenobiótico;
- Avaliar a expressão das proteínas de estresse (*Heat shock proteins*, Hsp), Hsp70, em amostras de brânquias e hepatopâncreas de espécimes de *L. vannamei* expostos ao xenobiótico;
- Avaliar o efeito da exposição ao xenobiótico na atividade das enzimas Acetilcolinesterase (AChE) e Glutathione-S-transferase (GST) nas brânquias e hepatopâncreas e a atividade das enzimas Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) na hemolinfa dos animais;

3. Material e Métodos:

3.1. Material Biológico

Foram utilizados camarões marinhos adultos (reprodutores), machos e fêmeas, da espécie *Litopenaeus vannanei* (BOONE, 1931), provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aqüicultura (AQI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2. Delineamento do experimento

3.2.1. Aclimação

Os animais trazidos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) foram mantidos em tanques circulares de 100 litros, com água do mar filtrada, em condições controladas de pH, temperatura ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) e salinidade (34‰), sob aeração constante, por um período inicial de 20 dias (aclimação). Os animais foram alimentados diariamente. Após esse período, os animais foram submetidos à exposição ao Carbofuran. Somente animais aparentemente saudáveis foram utilizados nos experimentos.

3.2.2. Exposição

A exposição ao Carbofuran foi realizada em um tanque circular de 100 L, ao qual foi adicionado o composto diluído em água do mar filtrada, na concentração final de 50 µg/L. A água dos tanques permaneceu com aeração constante, tendo sido efetuada uma renovação parcial diária. Os animais (n=5) foram expostos ao Carbofuran por um período de 48 horas. Um grupo de animais (n=5) foi mantido em um outro tanque idêntico, nas mesmas condições, por igual, período (grupo não exposto). Os animais foram monitorados 3 vezes ao dia, em horários fixos, durante 20 minutos, quanto ao padrão de comportamento, mobilidade, coloração, ocorrência de mudas e frequência de alimentação. Ao final do período de exposição, os animais (grupo exposto e grupo controle) foram coletados.

3.3. Coleta e preparação das amostras

Os animais foram retirados dos tanques, ao final do período de exposição, com o auxílio de uma rede de nylon. Antes da coleta dos tecidos, foi realizada a biometria dos animais.

3.3.1 Hemolinfa - A coleta foi realizada por punção ventral direta entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa com agulha hipodérmica de 30 x 8 mm, na presença de citrato de sódio 10% (1:1) (LIGHTNER, 1996). Para a obtenção do plasma e do lisado de hemócitos, a hemolinfa coletada foi centrifugada a 2000 xg por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi alíquotado (DEOLINDO, 2001). O precipitado foi ressuspenso em tampão cacodilato (BATISTA, 1997). Alíquotas das amostras foram mantidas a -80°C até serem analisadas.

3.3.2 Tecidos - Após a coleta da hemolinfa, as brânquias e o hepatopâncreas dos animais foram retirados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. A homogeneização dos tecidos foi realizada em tampão Tris-HCl 0,02 M; Sacarose 0,25 M; DTT 2 mM; PMSF 0,1 mM; pH 8,0, resfriado, utilizando-se o homogeneizador "Tissue tearor" (Biospec Prod. INC.). O homogeneizado das brânquias foi centrifugado a 10.000 xg durante 20 minutos a 4°C. No homogeneizado do hepatopâncreas, o sobrenadante resultante foi centrifugado novamente a 17.800 xg durante 70 minutos. Os sobrenadantes foram alíquotados e armazenados a -80°C para determinação de proteínas totais, imunodeteção da HSP 70, e, ainda, determinação das atividades enzimáticas.

3.4. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada pelo método de Peterson (1977), adaptado para microplaca (TECAN-Sunrise[®]), utilizando-se soro albumina bovina (Fração V, Sigma Chemical Co.) como padrão.

3.5. Avaliação da capacidade antioxidante

O ensaio para a avaliação da capacidade antioxidante da hemolinfa foi adaptado de Gutteridge e Quinlan (1993). O método baseia-se na capacidade de inibição da degradação da desoxirribose pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2 8,8 mM), na presença de ferro (Fe 1mM) e ácido ascórbico (7,5 mM) em tampão fosfato (0,08 M, pH 7,4). A capacidade antioxidante foi expressa em porcentagem de inibição em relação à degradação total da desoxirribose.

3.6. Expressão da proteína de estresse HSP 70

Alíquotas de homogeneizados de brânquias e hepatopâncreas contendo 20 µg e 40 µg de proteínas, respectivamente, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, sob condições desnaturantes (SDS 0,1%), de acordo com o método de Laemmli (1970). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (ECL Hybond, Amershan Pharmacia). Como anticorpo primário foi utilizado anticorpo policlonal anti-Hsp 70 humana (StressGen, diluição 1:3.000). Como anticorpo secundário foi utilizado anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (Amershan Pharmacia, diluição 1:1.000). O imunocomplexo foi detectado por quimioluminescência (kit ECL, Amershan Pharmacia). Para a densitometria das bandas foi utilizado o programa Scion Image (NIH).

3.7. Dosagem enzimática

3.7.1. Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade da AChE foi determinada nas brânquias e no hepatopâncreas, através do método proposto por Ellman et al. (1961). A amostra foi adicionada na reação entre o produto da hidrólise do substrato acetiltiocolina, tiocolina, com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), em pH 8,0, monitorado a 412 nm durante 3 minutos a 30°C. A atividade da enzima foi expressa em µmol de produto formado por µg de proteína.

3.7.2. Glutathiona-S-transferase (GST)

A atividade da GST foi determinada nas brânquias e no hepatopâncreas, pelo método adaptado de Habig e Jacoby (1981) para ensaio com CDNB a 340 nm, durante 2

minutos a 30°C. A amostra foi adicionada a um meio de reação contendo 2 mM 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), 2 mM de glutatona reduzida (GSH) em tampão fosfato de potássio 0,1 M em pH 7,0. A atividade da enzima foi expressa em μmol por minuto por miligrama de proteína.

3.7.3. Alanina Aminotransferase (ALT)

A determinação da alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (GPT ou TGP) foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Kit Analisa Diagnóstica (cat. 252). As atividades destas enzimas foram expressas em valores de U RF/ml.

3.7.4. Aspartato Aminotransferase (AST)

A determinação da aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (GOT ou TGO) foi realizada de acordo com o protocolo descrito no Kit Analisa Diagnóstica (cat. 253). As atividades destas enzimas foram expressas em valores de U RF/ml.

4. Tratamento estatístico dos dados

Foi utilizado o teste paramétrico Análise de Variância (ANOVA), seguido do teste complementar de Tukey HSD para tamanhos amostrais diferentes ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste complementar de comparações múltiplas não paramétricas. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Statistica for Windows, versão 5.1.

5. Resultados

5.1. Observação e coleta dos animais expostos ao Carbofuran

A exposição ao Carbofuran, provocou alterações na mobilidade e no aspecto físico dos animais. Estas alterações foram mais evidentes ao término do período de exposição, no momento da coleta. Foram observadas mudanças na coloração externa dos animais, no cefalotórax, apêndices e na região do urópode, a qual se apresentou vermelha. Também foram registradas alterações no padrão natatório neste grupo de animais. Ainda no grupo tratado, foi registrado canibalismo, após 30 horas de exposição ao composto.

5.2 Biometria dos animais

Os dados biométricos dos animais estão representados na Tabela 1. O comprimento total médio dos organismos amostrados foi de $16,85 \pm 1,98$ cm para os animais tratados e $16,94 \pm 0,80$ cm para os animais não-tratados. O peso total médio obtido foi de $44,24 \pm 9,68$ g nos animais tratados e $39,67 \pm 4,64$ g nos animais não-tratados. Não foi observada diferença estatística significativa relativa aos dados biométricos (comprimento total e peso) entre os grupos (tratado e não-tratado).

5.3. Concentração de proteínas totais

Os valores relativos à concentração de proteínas totais, na hemolinfa, brânquias e fração citosólica do hepatopâncreas, estão apresentados na Tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas totais na hemolinfa e nas brânquias, entre os indivíduos do grupo tratado e aqueles do grupo não-tratado. Tampouco foi observada diferença significativa entre estes tecidos. No hepatopâncreas, a concentração de proteínas não variou entre os grupos de animais, porém foi maior quando comparada às brânquias e a hemolinfa, tendo sido observada diferença estatística entre os tecidos.

5.4. Capacidade antioxidante do plasma

A capacidade antioxidante do plasma manteve-se em torno de $36,7 \pm 8,03\%$ nos animais tratados e $40,5 \pm 5,9\%$ nos animais não-tratados (Figura 2). Não foi observada

diferença estatística significativa entre os grupos tratado e não-tratado, para este biomarcador.

5.5. Expressão da proteína de estresse HSP 70

Uma banda imunoreativa com o anticorpo anti-HSP70 utilizado (anticorpo anti-HSP70 humana) foi detectada por *Western blotting* no homogeneizado de brânquias e de hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* (Figura 3). Em ambos tecidos, esta banda, correspondente à formação de um imunocomplexo com o anticorpo, apresentou um peso molecular aparente de 70 kD. A densitometria das bandas demonstrou variação individual significativa nos níveis de HSP 70 nos animais.

5.6. Dosagens enzimáticas

5.6.1. Acetilcolinesterase (AChE)

Nos animais expostos ao Carbofuran não foi observada uma diferenças significativas na atividade da acetilcolinesterase (AChE) nas brânquias ($128,08 \pm 62,70 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) em relação aos valores nos animais não-expostos ($182,79 \pm 110 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) (Figura 4A). No hepatopâncreas, a atividade enzimática determinada nos animais tratados ($15,9 \pm 4,9 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) não diferiu, estatisticamente, dos animais não-tratados ($17,7 \pm 9,4 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) (Figura 4B). A atividade da AChE no hepatopâncreas foi menor quando comparada com a das brânquias.

5.6.2. Glutathione-S-transferase (GST)

Nenhuma alteração significativa na atividade da enzima Glutathione-S-transferase (GST) foi observada nas brânquias dos animais expostos ($383,18 \pm 56,86 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) e dos não-expostos ($378,75 \pm 165 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) ao Carbofuran (Figura 5A). No hepatopâncreas a diferença na atividade da GST entre os animais tratados ($82,42 \pm 19,2 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) e não-tratados ($90,46 \pm 36,5 \mu\text{mol}/\mu\text{g}$ proteínas) não se mostrou estatisticamente significativa (Figura 5B). Entre os tecidos, a atividade da GST foi menor no hepatopâncreas do que nas brânquias dos animais.

5.6.3. Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST)

Os valores individuais das determinações plasmáticas da ALT e da AST nos animais

expostos a Carbofuran e do grupo controle estão reunidos na Figura 6. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os animais tratados e não-tratados, tanto para a ALT quanto para a AST. Os valores obtidos para a ALT foram menores que os obtidos para a AST.

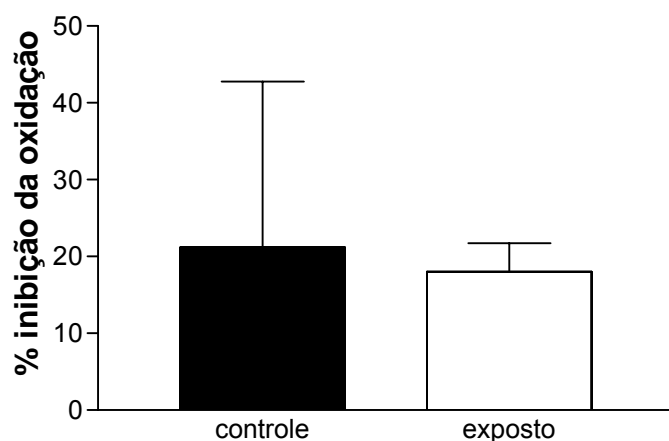


Figura 2 – Capacidade antioxidante do plasma de *Litopenaeus vannamei*: □ animais expostos a Carbofuran (n=5) por 48 horas em laboratório; ■ animais não-expostos (n=5) (controle) mantidos nas mesmas condições por igual período.

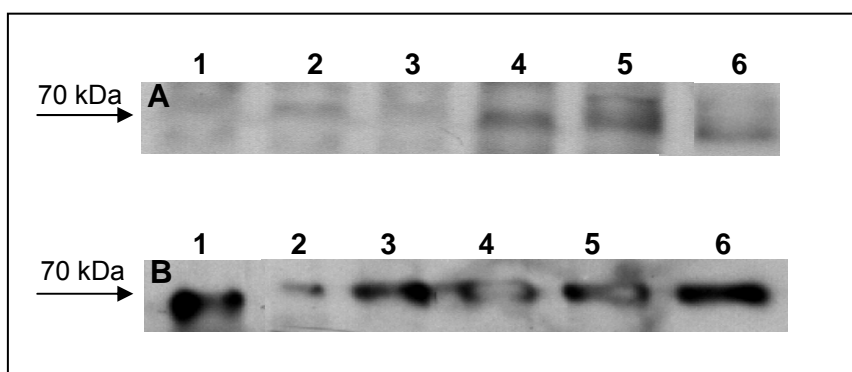


Figura 3 – Expressão da proteína de estresse (HSP 70) em brânquias (A) e hepatopâncreas (B) de *Litopenaeus vannamei* expostos a Carbofuran por 48 horas em laboratório. 1A – 3A - animais do grupo não-exposto; 4A – 6A - animais do grupo exposto; 1B – 3B - animais do grupo não-exposto; 4B – 6B - animais do grupo exposto.

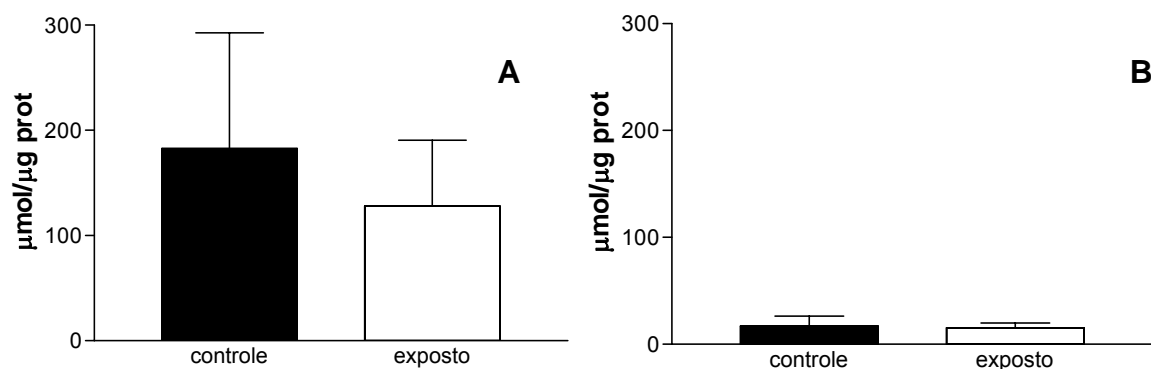


Figura 4 – Atividade da enzima acetilcolinesterase em brânquias (A) e hepatopâncreas (B) de *Litopenaeus vannamei* expostos a Carbofuran (n=5) por 48 horas em laboratório.

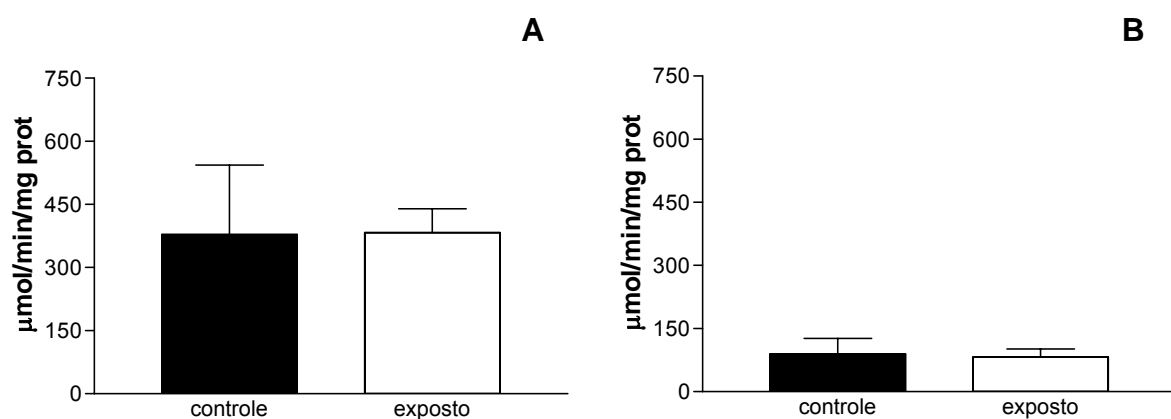


Figura 5 – Atividade da enzima Glutathione-S-transferase em brânquias (A) e hepatopâncreas (B) de *Litopenaeus vannamei* expostos a Carbofuran (n=5) por 48 horas em laboratório.

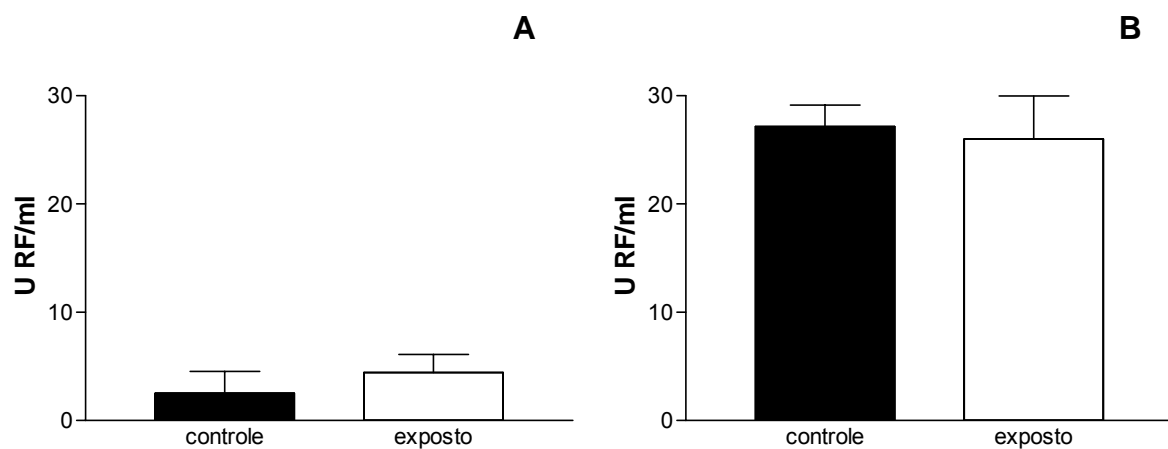


Figura 6 – Atividade das enzimas Alanina Aminotransferase (A) e Aspartato Aminotransferase (B) em hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* expostos a Carbofuran (n=5) por 48 horas em laboratório.

Tabela 1: Dados de biometria (peso total e comprimento) e valores da concentração de proteínas totais para hemolinfa, brânquias e hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei* expostos a Carbofuran. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão.

Tratamento	Peso total (g)	Comprimento (cm)	Proteínas brânquia ($\mu\text{g/mL}$)	Proteínas hemolinfa ($\mu\text{g/mL}$)	Proteínas hepatopâncreas ($\mu\text{g/mL}$)
Exposto	44,24 \pm 9,7	16,85 \pm 1,98	3,478 \pm 0,45	6,640 \pm 3,43	8,742 \pm 1,75
Controle	39,67 \pm 4,64	16,94 \pm 0,80	3,230 \pm 0,56	4,607 \pm 4,85	7,454 \pm 2,15

6. Discussão

Pesticidas podem ser introduzidos em lagoas costeiras ou estuário através da aplicação direta, derrames acidentais, lixiviação, drenagem ou precipitação dos resíduos das plantações, além do uso direto na aquicultura como controle de pragas (GALINDO REYES et al., 2000; COMOGLIO et al., 2005).

A persistência dos agrotóxicos é expressa com o fator de meia-vida, o qual corresponde ao tempo necessário para que a concentração do ingrediente ativo seja reduzida pela metade, estimando-se, assim, a sua permanência no ambiente sob determinadas condições (GALLO, 1988). O tempo de meia-vida do Carbofuran pode variar de acordo com as condições abióticas, degradando ou mantendo o composto ativo, como é o caso da acidez do meio (HIRATA; SKORTZARU; NARCISO, 2003). De acordo com HOWARD (1989), o tempo de meia-vida do Carbofuran na água é de oito, duas e uma semanas para pH 6,0, 7,0 e 8,0 respectivamente.

Pelo fato da grande maioria dos inseticidas carbamatos apresentarem na estrutura a função éster, o seu comportamento em água é importante sob dois aspectos: eles estão sujeitos à reação de hidrólise, o que tanto pode diminuir a ação inseticida como, também, aumentar a toxicidade pela formação de subprodutos mais tóxicos (HIRATA; SKORTZARU; NARCISO, 2003). No presente trabalho, o pH da água não foi responsável por causar alterações na toxicidade do carbofuran, uma vez que o mesmo manteve-se em torno de 7,0 (dados não mostrados).

A fotodegradação é outro fator que pode contribuir para a inativação do carbofuran no ambiente aquático, além da sua susceptibilidade à degradações microbiológicas (EXTOXNET, 1998). No presente trabalho, os tanques foram mantidos em um local onde a exposição à luz foi sensivelmente minimizada e sob temperatura controlada (dados não mostrados), no sentido de não promover a inativação do composto. No entanto, análises químicas da água não foram realizadas.

Devido à falta de informações referentes a doses sub-letais dos inseticidas carbamatos e seus efeitos em camarões peneídeos, a concentração de Carbofuran utilizada no presente trabalho foi baseada em experimentos prévios, conduzidos em ostras (ZANETTE et al., 2002), mexilhões e ostras (ALVES et al. 2002), cujas doses utilizadas foram comparadas como os valores de LC₅₀ para crustáceos e insetos. Estudos conduzidos por Hirata, Dias e Rosa (2002), determinaram valores de LC₅₀ e 9,7 µg/mL para *Drosophila melanogaster* expostas a Carbofuran.

A inibição da AChE tem sido extensivamente utilizada como um biomarcador de efeito e exposição a inseticidas, principalmente organofosforados e carbamatos, com o objetivo de monitorar os efeitos destes contaminantes nos organismos vivos (BOCQUENÉ; ROIG; FOURNIER, 1997). Zanette et al. (2002) observaram uma maior inibição da AChE na brânquia de ostras *Crassostrea rhizophorae* expostas ao Carbofuran quando mantidas em salinidade 35 ppm.

Vários autores têm tentado correlacionar a inibição da AChE com a mortalidade dos organismos, para estabelecer níveis que possam ser perigosos para a sobrevivência das espécies. Entretanto, segundo Montserrat, Bianchini e Rebelo (1997), esta relação varia de acordo com a espécie, o tipo de composto e as condições de exposição. A inibição da AChE tem sido extensamente estudada em vários vertebrados e invertebrados, principalmente insetos, entretanto poucos estudos têm sido conduzidos para esta enzima em peneídeos.

Nas condições deste trabalho não foi observada uma inibição significativa na atividade da AChE frente à exposição a Carbofuran, limitando-se a uma tendência de, inibição desta enzima nas brânquias dos animais expostos, indicando que o sistema de transmissão de impulso nervoso, aparentemente, manteve-se ativo nestes animais.

A capacidade antioxidante do plasma de espécimes de *Litopenaeus vannamei*, quantificada pelo método de inibição da oxidação da desoxirribose induzida por ferro, não mostrou diferença significativa entre o grupo exposto e o controle. Aparentemente, o inseticida não promoveu o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio na hemolinfa dos camarões analisados. Entretanto, esta metodologia foi primeiramente

proposta para mamíferos e, então, utilizada para peixes e invertebrados. Trabalhos realizado com tilápias (*Oreochromis niloticus*), expostas a efluente industrial (ALVES, 2003) e com mexilhão *Perna perna* (PIRES et al., 2003) e ostras-do-mangue *Crassostrea rhizophorae* (SILVA, 2004), ambos expostos à óleo diesel, também não encontraram diferença significativa na capacidade antioxidante do plasma. Um aumento na taxa de biotransformação de xenobióticos, decorrente da exposição ao xenobiótico, poderia acarretar em um conseqüente aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), potenciais indutores de estresse oxidativo, com efeitos nocivos sobre as células. Holmblad e Söderhall (1999) destacam a importância de proteínas plasmáticas entre as ferramentas para prevenir a formação de EROs. No caranguejo *Pacifastacus leniusculus* sabe-se que a proteína ferritina tem a capacidade de mediar tal processo (HUANG; LAW; SÖDERHÄL, 1996), entretanto, pouca informação é encontrada a respeito do camarão *L vannamei* e das proteínas presentes no plasma diretamente envolvidas na capacidade antioxidante. Por outro lado, a determinação da atividade das principais enzimas antioxidantes, como a Catalase (CAT) e a Superóxido Dismutase (SOD), por exemplo, poderia contribuir para indicar o grau de estresse oxidativo potencial dos animais tratados.

As GSTs são isoenzimas oriundas de uma família de multigenes que pertencem ao grupo mais importante de enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos, tais como herbicidas, inseticidas e agentes carcinogênicos (HODGSON; LEVI, 1994; ALMILI et al., 2002). Apesar da atividade da GST ser amplamente utilizada como biomarcador de exposição, a ausência de informação a respeito desta enzima em crustáceos peneídeos deve ser destacada. No presente trabalho, não foi observada diferença na atividade da GST nas brânquias dos animais tratados, quando comparados ao grupo não-tratado. Por outro lado, apesar da diminuição na atividade da GST no hepatopâncreas dos animais tratados, esta não apresentou diferença estatística. Os resultados obtidos, não indicam, necessariamente, que este sistema de defesa não tenha sido ativado na presença de Carbofuran. O decréscimo observado no hepatopâncreas destes animais poderia estar indicando uma alteração nos níveis da atividade desta enzima (inibição), como parte de uma

resposta metabólica inicial, ao composto tóxico. De fato, a GST pode ser tanto ativada quanto inibida na presença de certos tipos de contaminantes, o que torna, muitas vezes, a atividade desta enzima um parâmetro complexo de ser avaliado (VAN DER OOST et al., 2003). Por outro lado, a dose e o tempo de exposição utilizados no presente estudo podem ter influenciado os resultados obtidos. Estes parâmetros devem ser melhor investigados, utilizando um maior número de animais.

A aspartato aminotransferase (AST), também denominada glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT), é uma enzima chave no metabolismo de aminoácidos, sendo encontrada como AST mitocondrial e citoplasmática em vertebrados, invertebrados, além de plantas, onde várias isoformas têm sido descritas. AST catalisa a reação reversível de transaminação entre o aspartato e o α -cetoglutarato produzindo glutamato e oxalacetato (BOUTET et al., 2005). A ALT, juntamente com a AST, também denominada glutamato-piruvato transaminase (GPT) têm sido largamente utilizadas no diagnóstico clínico de lesões cardíacas e hepáticas, causadas por infarto do miocárdio e toxicidade de drogas. Os testes séricos utilizando estas enzimas (SGPT e SGOT) têm sido empregados no monitoramento de lesões hepáticas causadas pela exposição a solventes, como o clorofórmio, em empregados da indústria química (TIMBRELL, 2002).

Estudos envolvendo as enzimas AST e ALT em respostas a compostos tóxicos como metais pesados e pesticidas, ou, ainda, estresse causado por fatores abióticos, têm sido amplamente relatados para espécies de peixe (CHIEN; PAN; HUNTER, 2003, ALVES, 2003). Contudo, para camarões cultivados e invertebrados em geral, os estudos relativos a estas enzimas não se encontram tão avançados (BOUTET et al., 2005). Galindo-Reyes et al. (2000) relacionaram os níveis séricos das enzimas AST e ALT, em camarões peneídeos, com os efeitos promovidos por contaminação pelos pesticidas DDT, Lindano, Clordano, Lorsban, Gusathion, Folidol, Diazinon e Tamaron. Estes autores relatam que os inseticidas não alteraram os níveis de AST e ALT, nos camarões expostos. Alterações no hepatopâncreas, músculos e brânquias foram monitoradas em *Metapenaeus monoceros*

após exposição a concentrações subletais aos pesticidas dos pesticidas *Phosphamidon*, Metil-Paration, DDT e Lindano. A exposição promoveu um aumento dos níveis da aspartato e da alanina aminotransferase, sugerindo alterações no metabolismo do nitrogênio, com conseqüências sobre a gliconeogênese, conforme sugerido pelos autores (REDDY; RAO, 1990).

Entretanto a atividade destas enzimas na hemolinfa de crustáceos parece não ser tão elevada quanto em peixes e outros animais marinhos, os quais apresentam o plasma como o tecido adequado para as determinações enzimáticas de AST e ALT (GALINDO-REYES et al., 2000).

No presente estudo, as determinações plasmáticas (realizadas na fração não-celular da hemolinfa) da AST e da ALT nos animais expostos a Carbofuran e do grupo controle apresentaram níveis muito baixos. De modo semelhante, a relação entre a atividade dessas enzimas, expressa como a razão AST/ALT também não evidenciou diferenças entre os animais tratados e os animais não-tratados (resultados não mostrados). Este resultado poderia indicar que, nas condições deste experimento, os níveis dessas enzimas não foram alterados. Por outro lado, devemos ressaltar que a metodologia aqui empregada pode não representar a mais adequada para a avaliação destas enzimas na hemolinfa, dado, por exemplo, os baixos níveis de atividade das mesmas neste tecido.

Nas últimas décadas, as proteínas de choque térmico, especialmente HSP 70 e 60, têm encontrado ampla utilização no monitoramento ambiental, visando avaliar a exposição de organismos aquáticos a contaminantes. As HSP protegem o organismo contra condições ambientais que de outra maneira poderiam ser letais (LINDQUIST; CRAIG, 1988). As HSP agem como chaperonas moleculares, protegendo a célula contra o efeito proteotóxico causado por xenobióticos, assegurando assim, a manutenção da conformação nativa das proteínas celulares. Em crustáceos, várias isoformas da HSP 70 parecem estar envolvidas na resposta ao estresse (SNYDER; MULDER, 2001). Neste trabalho, os animais expostos a Carbofuran apresentaram níveis de HSP 70 maiores dos que os animais do grupo controle, indicando uma indução destas proteínas como resposta ao estresse, promovido pela

exposição ao composto. Os resultados de um estudo realizado com o microcrustáceo, *Daphnia magna*, demonstraram a relação entre a redução da toxicidade do *Malathion* e a indução da síntese de Hsp 70, nos organismos previamente expostos a um choque térmico de 34°C (BOND; BRADLEY, 1995).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, podemos inferir que a concentração, ou ainda, o tempo de exposição ao inseticida não tenha sido suficiente para desencadear uma resposta bioquímica que promova alterações significativas nos biomarcadores utilizados, como mencionado acima. Em função do tempo, existem duas possibilidades para explicar os resultados. O tempo de exposição, 48 horas, pode ter sido muito curto para que nesta concentração, promovesse respostas bioquímicas mais intensas, considerando os biomarcadores aqui analisados. Por outro lado, não podemos descartar totalmente a hipótese que, nestas 48 horas, algum tipo de degradação possa ter ocorrido com o composto, diminuindo sua toxicidade, mesmo considerando todos os cuidados durante a exposição.

O estudo da degradação do Carbofuran em função do tempo de exposição e da variação da temperatura foi conduzido por Almeida, Reyes e Rath (2001) para avaliar a quantidade do inseticida que estaria potencialmente biodisponível. Estes autores verificaram que a degradação do Carbofuran é proporcional tanto ao tempo de exposição, como à variação da temperatura, portanto, o Carbofuran presente na água pode ter sido, ainda degradado parcialmente em função destes parâmetros, e, não tendo causado alterações significativas nos biomarcadores utilizados.

Outro fator que pode ter influenciado os resultados está relacionado com a utilização de animais adultos, do setor de reprodução da instituição de origem. Sabe-se que variações em parâmetros bióticos como sexo, idade e maturação sexual ou desova podem influenciar nas respostas bioquímicas, dificultando a interpretação dos resultados (FORGET; BELIAEFF; BOCQUENÉ, 2003). A sensibilidade dos animais ao composto utilizado pode ter sido influenciada pela taxa metabólica. Lund, Fulton e Key (2000), afirmam que a taxa metabólica é diretamente proporcional à sensibilidade dos organismos a contaminação.

Assim, camarões no estágio de pós-larvas e juvenis, os quais apresentam metabolismo mais acelerado em razão da proliferação celular e do rápido crescimento, seriam, segundo estes autores, mais susceptíveis a contaminação por compostos tóxicos, como os inseticidas, do que os animais adultos utilizados nesse estudo.

Portanto, sugerimos um aprofundamento deste estudo com a realização de outros experimentos, onde os biomarcadores possam ser avaliados, em etapas distintas do ciclo de vida de *Litopenaeus vannamei*, não só em relação a diferentes concentrações de Carbofuran, mas também em relação ao tempo de exposição a este composto. Sugerimos, ainda, a análise de outros biomarcadores bioquímicos, em conjunto com os aqui avaliados, bem como o estudo futuro de outros compostos tóxicos que possam estar potencialmente presentes na água que abastece os cultivos de camarões.

Capítulo 2

Prevalência natural do vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa (*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus*) – IHHNV em uma população de camarões marinhos cultivados, *Litopenaeus vannamei*.

1. Introdução

No Brasil, embora o cultivo de camarão marinho, como atividade comercial, tenha seu registro datado do início dos anos 80, o mesmo desenvolveu-se timidamente até meados dos anos 90. A partir do biênio 1995 - 1996, coincidindo com a plena adoção e disseminação da espécie *Litopenaeus vannamei*, importada do Pacífico Sul, houve um crescimento dinâmico do setor. Com o domínio do ciclo reprodutivo e a auto-suficiência na produção de náuplios e pós-larvas de *L. vannamei*, o setor passou a usar a tecnologia desenvolvida em outros países para essa espécie, a qual, associada às práticas de manejo de água, contribuiu para o expressivo crescimento da produção de camarão cultivado no país nos anos subseqüentes (ROCHA, 2003).

Apesar dos resultados otimistas da carcinicultura brasileira, tem sido observada, em escala mundial, uma desaceleração na expansão das áreas de cultivo e no volume da produção aquícola, que em 2000 representava 27,3% da produção mundial total de peixes, crustáceos e moluscos (FAO, 2004). Esta situação tem sido atribuída, principalmente, a uma degradação do meio ambiente, um manejo inadequado das condições de cultivo e perdas na produção ocasionadas por enfermidades (ROCH, 1999; HERNANDÈZ, 2000).

Na carcinicultura marinha, a incidência de enfermidades virais tem se agravado, apresentando-se como um importante obstáculo econômico para o cultivo de camarões marinhos. Apesar de inofensivas aos seres humanos, as infecções virais no cultivo de camarões freqüentemente acarretam mortalidades elevadas, levando, muitas vezes, a uma completa perda na produção (BROWDY; BRATVOLD, 1998).

Entre as enfermidades virais de camarões peneídeos, cinco vírus destacam-se por seu alto poder de infecção, causando grandes perdas nos cultivos, em um ou mais estágios de vida desses crustáceos: Vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoética Infecciosa (*Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus* - IHNV), Baculovírus penaei (*Baculovirus penaei* - BP), Vírus da Síndrome de Taura (*Taura Syndrome Virus* - TSV), Vírus da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus* - WSSV) e Vírus da Cabeça Amarela

(*Yellow Head Virus* - YHV) (JSA, 1997). Mais recentemente, um novo agente viral foi responsável por perdas consideráveis na produção de camarões na região nordeste do Brasil, o vírus da Necrose Infecciosa Muscular – NIM (*Infectious Myonecrosis Virus* – IMNV) (OIE, 2004).

No hemisfério ocidental, os problemas originados pelo TSV e pelo IHHNV causaram sérias epizootias em praticamente todo o continente americano. A preocupação na indústria tem aumentado, já que estes patógenos estão presentes tanto em populações de camarão selvagens como em cultivados (LIGHTNER et al., 1997). Perdas milionárias na indústria camaroneira foram desencadeadas por pandemias causadas pelo YHV e WSSV nas regiões do Índico e do Pacífico (LIGHTNER et al., 1997; MACIEL, 2002).

A carcinicultura brasileira utiliza, quase que exclusivamente, o *Litopenaeus vannamei*, uma espécie exótica, cuja importação foi proibida a partir de junho de 1999 para prevenir a entrada dos vírus WSSV e YHV (ROCHA, 2003). Segundo Rocha (2003), recursos e esforços do setor privado estão sendo direcionados para programas e projetos de melhoramento genético do plantel existente. As ações visam tanto o desempenho técnico como a resistência a doenças virais, especialmente ao IHHNV. Pesquisas em outras partes do mundo têm dado atenção à resistência ao WSSV, como, por exemplo, o estudo relatado por TANG et al.(2002) com *Litopenaeus stylirostris*.

No Brasil, até o final da década de 90, foram registrados relatos da presença do IHHNV, TSV. Entretanto, segundo ROCHA (2003), as manifestações das doenças causadas pelo IHHNV e TSV foram mantidas em um nível de convivência aceitável, após a adoção das práticas de manejo e procedimentos de produção recomendados. Estas práticas e procedimentos podem ser decisivos, no sentido de diminuir significativamente o grau de estresse dos animais nos cultivos, e, conseqüentemente a susceptibilidade a doenças (BACHÈRE, 2000). Estas medidas são igualmente relevantes frente à ausência de informações relacionadas a uma dada epidemiologia, como é o caso do vírus IHHNV, o que

pode levar a um surpreendente aumento da prevalência do vírus, seguido de perdas na produtividade (MOTTE et al., 2003).

O vírus da Necrose Hipodermal e Hematopoiética Infecciosa - IHHNV - é um vírus icosaédrico, não envelopado, com 22nm de diâmetro, sendo seu genoma constituído por DNA de fita simples, com aproximadamente 4,1 kb de comprimento. De acordo com suas características, este vírus foi classificado como membro da família Parvoviridae (BONAMI et al., 1990). Ele infecta camarões cultivados *Litopenaeus vannamei* e *Litopenaeus stylirostris*, bem como algumas populações selvagens (MOTTE et al., 2003). Este vírus foi inicialmente observado em 1980 no Havaí, em populações cultivadas de *L. stylirostris*.

O IHHNV apresenta como sinais clínicos deformidades no rostrum, flagelo antenal enrugado, deformidades cuticulares e taxa de crescimento reduzida. Na espécie *L. vannamei* essa infecção pode se manifestar através de animais nanicos, com deformidades ao longo do corpo, o que é conhecido como *Runt Deformity Syndrome* – RDS. Nos cultivos, a infecção do IHHNV pode ser resultante da transmissão horizontal, através da ingestão indivíduos mortos infectados e contato com água ou equipamentos contaminados. A ocorrência de transmissão vertical tem sido considerada, desde que foram detectadas partículas virais nos ovários e ovócitos (NUNES; MARTINS, 2002; MOTTE et al., 2003).

É importante ressaltar que a simples presença de um patógeno no sistema de cultivo não caracteriza a doença. Segundo Lightner e Redman (1998), sob certas condições, o hospedeiro e o patógeno em potencial podem coexistir com pequeno ou nenhum efeito adverso sobre a população cultivada. Estes mesmos autores aconselham que os fatores ambientais, além da observação dos animais cultivados, devem ser considerados na determinação da causa de uma enfermidade. Estas informações podem ser obtidas através da observação de sinais clínicos, do histórico dos cultivos e da realização de testes diagnósticos e/ou análises laboratoriais.

A susceptibilidade aos patógenos ou a infecções oportunistas é fortemente influenciada pelo vigor imunológico do camarão (MARQUES; BARRACCO, 2000;

PERAZZOLO et al., 2002), porém, pouco se conhece a respeito da influência dos parâmetros ambientais sobre a capacidade dos camarões de combater uma infecção. Contudo, especula-se que alguns fatores do ambiente, entre eles a temperatura (JIRAVANICHPAISAL; SÖDERHALL; SODERHALL, 2004), a salinidade (ÁLVAREZ et al., 2004), o oxigênio dissolvido (LE MOULLAC et al., 1998), o pH e os compostos nitrogenados (TSENG; CHEN, 2004), podem ter um efeito importante no desencadeamento de um processo infeccioso. Cabe salientar que as práticas de cultivo freqüentemente causam estresse aos animais, por meio dos parâmetros físicos (mudanças na temperatura), químicos (qualidade da água) ou biológicos (nutricionais ou infecções) (MARQUES; BARRACCO, 2000; PERAZZOLO et al., 2002).

Conseqüentemente, o diagnóstico e o manejo devem ser simultaneamente melhorados para sustentar o aumento da demanda, especialmente em países em desenvolvimento, onde a aquicultura marinha contribui para aliviar condições sociais de pobreza e desnutrição (ROCH, 1999). Apesar de alguns relatos de erradicação do TSV em algumas regiões determinadas, como por exemplo, nos Estados Unidos (PANTOJA, C. R., comunicação pessoal), não existem, até o momento, tratamentos que permitam a erradicação irrestrita de enfermidades virais em cultivos de camarões peneídeos. Desta forma, a prevenção, mediante a utilização de métodos diagnósticos eficientes, torna-se uma prioridade econômica e ecológica para a indústria de camarão marinho (BACHÈRE et al., 1999). Assim, técnicas tradicionais de monitoramento dos cultivos, baseadas em sinais clínicos e histopatologia, devem estar aliadas aos métodos moleculares de monitoramento (BACHÈRE, 2000).

As técnicas de biologia molecular e genética, combinadas e aplicadas ao diagnóstico e à identificação de genes de interesse para a produção, representam uma estratégia importante para incrementar não só a carcinicultura, mas a aquicultura, como um todo. No que se refere ao diagnóstico, a hibridização *in situ* (ISH) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são metodologias que apresentam alto nível de detecção de patógenos

(CARR et al., 1996).

Métodos moleculares têm sido recentemente aplicados no diagnóstico de algumas doenças infecciosas em peneídeos. As primeiras sondas genéticas foram desenvolvidas, em 1992, a partir do DNA viral extraído e purificado de camarões *Litopenaeus vannamei* e *L. stilyrostris*, infectados com o IHHNV (MARI et al., 1998). Tais sondas podem ser marcadas com a adição de elementos radioativos. Neste caso, faz-se necessário laboratórios com condições especiais e técnicos aptos a aplicar esta metodologia. Por outro lado, a aplicação de métodos de marcação não-radioativas tem promovido e ampliado o uso das metodologias baseadas em sondas genéticas em muitos laboratórios. Tal fato levou ao desenvolvimento de sondas não radioativas, marcadas com digoxigenina (DIG), para o IHHNV e a comercialização de um *kit* diagnóstico. Neste caso a hibridização da sonda com a seqüência alvo do vírus é realizada sobre um suporte de nitrocelulose (*Dot Blot*) (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

A implementação de procedimentos para diagnosticar o estado de saúde de camarões cultivados serve para detectar precocemente problemas no sistema de cultivo, como a presença de enfermidades ou condições ambientais adversas. Uma vez detectada uma infecção, a determinação da prevalência viral possibilita o monitoramento da mesma e alerta para que medidas emergenciais sejam tomadas, de modo a minimizar os efeitos negativos sobre a produção, reduzindo, assim, os prejuízos financeiros resultantes da perda ou mau desempenho do estoque cultivado.

O presente estudo combina a padronização e a aplicação da PCR e da hibridização por *Dot Blot*, na detecção e determinação da prevalência do vírus IHHNV, em uma população de camarões peneídeos cultivados, *L. vannamei*.

2. Objetivo Geral

- Realizar um estudo preliminar da prevalência natural do vírus IHHNV em espécimes adultos do camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), mantidos em cultivo, utilizando métodos moleculares.

2.1 Objetivos específicos

- Padronizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do vírus IHHNV;
- Comparar dois métodos moleculares, *Dot Blot* e PCR, para a detecção do vírus IHHNV;
- Estabelecer a prevalência natural do vírus IHHNV em uma população de camarões adultos, *Litopenaeus vannamei*, cultivados.

3. Material e Métodos:

3.1. Material Biológico

Foram utilizados camarões marinhos adultos (reprodutores), machos e fêmeas, da espécie *Litopenaeus vannanei* (Boone, 1931) provenientes do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM), Departamento de Aqüicultura (AQI), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.2. Aclimação

Os animais trazidos do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) foram mantidos em tanques circulares de 100 litros, com água do mar filtrada, em condições controladas de pH, temperatura ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) e salinidade (34‰), sob aeração constante, por um período inicial de 20 dias (aclimação). Os animais foram alimentados diariamente. Somente animais aparentemente saudáveis foram utilizados no experimento.

3.3. Coleta das amostras

Os animais foram retirados do tanque, com o auxílio de uma rede de nylon. Antes da coleta dos tecidos foi realizada a biometria dos animais. Os animais foram anestesiados por hipotermia (em gelo) antes da coleta dos tecidos. Foi realizada a coleta da hemolinfa por punção ventral direta, entre o último esternito cefalotorácico e o primeiro abdominal, utilizando-se uma seringa com agulha hipodérmica de 30 x 8 mm, na presença de citrato de sódio 10% (1:1) (LIGHTNER, 1996). Foram retirados, ainda, dois pares de pleópodes e as brânquias dos animais, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenados a -80°C .

3.4. Detecção do IHNV

3.4.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi realizada a partir das amostras de brânquias, hemolinfa e pleópodes, utilizando-se protocolo adaptado de Maciel (2002). Os tecidos foram digeridos em solução de lise contendo proteinase K (1 mg/mL) e SDS (1%) por 90 min a

65°C. Uma segunda incubação foi realizada por 60 min a 55°C, após a adição de cloreto de sódio (3M) e CTAB (10%). Após a adição de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v), o material foi centrifugado a 14000 rpm por 10 min. Ao sobrenadante foi adicionado álcool isopropílico. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e seco a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspendido em tampão TE 1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). Após a extração, uma alíquota do material foi utilizada para a determinação espectrofotométrica da concentração, através da determinação da razão da absorbância a 260 e 280 nm. O material extraído foi mantido a 4°C até ser utilizado.

3.4.2. Eletroforese em gel de agarose

O grau de integridade do DNA extraído foi avaliado, através de eletroforese em gel de agarose (Ultrapure – Gibco BRL), diluída a 1% em TBE 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM) e fundida em microondas, utilizado-se o sistema Hoeffer HE 33 (Amershan Pharmacia Biotech). As amostras foram diluídas em Tris 10 mM pH 7,0 e tampão da amostra 10X BlueJuice (Gibco BRL), sendo em seguida aplicadas no gel. O marcador de peso molecular utilizado foi *DNA ladder* 100bp (Invitrogen), diluído no corante Blue/Orange 6X (Invitrogen). A eletroforese foi realizada a 120 V, utilizando-se o tampão TBE 0,5 X. O resultado final foi visualizado em luz UV.

3.4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A prevalência do vírus IHNV foi monitorada por PCR, cujas condições foram inicialmente padronizadas. Os iniciadores foram desenhados a partir de seqüências específicas do genoma viral, depositadas no GenBank utilizando-se o Programa OLIGO 3.0. As seqüências dos iniciadores utilizados estão mostradas abaixo:

IHNV-F: 5' TCGGAAACTGAACACTGGCCT 3'

IHNV-R: 5' CGGCGTGTTCTTCGTCTTCATT 3'

Cada reação de amplificação foi realizada utilizando-se 1 µL de DNA (10ng/µL), extraído das brânquias dos camarões, Taq DNA Polimerase (5U) (Gibco BRL), tampão de

reação da enzima Taq DNA Polimerase 1X (PCR *Buffer* 10X: Tris-HCl 200 mM pH 8,4, KCl 500 mM), MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP, iniciador IHHNV-F 1µM e iniciador IHHNV-R 1µM. O volume final da reação foi 25µL. O tamanho do fragmento a ser amplificado, utilizando-se os iniciadores descritos, corresponde a 512 pb.

As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycler personal* (Eppendorf), utilizando-se o programa abaixo:

Programa IHHNV

3 min	30 s	45 s	45 s	10 min	Manter
94° C	94° C	55° C	72° C	20° C	4° C
30 vezes					

3.4.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)

Os produtos de PCR foram visualizados em gel de poliacrilamida (PAGE) 8,4%, utilizando-se o sistema MiniProtean II da BioRad (BioRad Laboratories, Richmond, CA). A concentração do gel foi escolhida em função do tamanho esperado do produto (ítem 3.3.3).

Para a aplicação no gel, 5 µL das amostras foram diluídos em 2,0 µL de tampão da amostra (TBE *dye*: sacarose 20%, azul de bromofenol 0,1%, TBE 1X). O marcador de peso molecular utilizado foi 100 bp DNA *ladder* e 1K *plus* DNA *ladder* (Invitrogen), diluído no corante Blue/Orange 6X (Invitrogen). As eletroforeses foram realizadas a 100 V, utilizando-se o tampão de corrida TBE 1X. Após incorporação de brometo de etídeo, o resultado foi observado sob luz UV em transiluminador e fotografado. A intensidade das bandas foi avaliada por densitometria de vídeo-imagem, utilizando-se o programa Scion Image (NIH) .

3.4.5. Dot Blot

Amostras de DNA genômico foram, também, monitoradas, utilizando-se o kit comercial *Dot Blot* para o vírus IHHNV (ShrimProbe® – IHHNV, DiagXotics, Inc.). O procedimento foi adaptado a partir das condições descritas pelo fabricante. Inicialmente, o DNA extraído das amostras de brânquias, hemolinfa e pleópodes foi imobilizado em membrana de nitrocelulose (HyBond-N). Após o bloqueio dos sítios inespecíficos com a solução bloqueadora, a membrana foi tratada com a solução de pré-hibridização por 30

minutos. A hibridização foi realizada com a sonda específica, marcada com digoxigenina, seguida da incubação da membrana com anticorpo anti-digoxigenina conjugado com fosfatase alcalina. O complexo formado foi detectado por reação colorimétrica. O resultado foi analisado imediatamente após o período de desenvolvimento da reação colorimétrica. A cor da reação e o seu padrão de intensidade foram comparados com o controle positivo, incluído no *kit*. Em cada membrana, além do controle positivo, uma alíquota de tampão de solubilização da amostra, de volume igual ao da amostra aplicada, foi incluída (controle negativo).

4. Resultados

DNA genômico foi extraído da hemolinfa, pleópodes e brânquias dos espécimes de *Litopenaeus vannamei*. A eficiência e o rendimento do protocolo de extração utilizado, adaptado de Maciel (2002), foram avaliados, inicialmente, pela determinação da Absorbância a 260 e 280 nm e, em seguida, através de eletroforese em gel de agarose.

A concentração das amostras, determinada espectrofotometricamente, não indicou grande variação entre a quantidade de DNA genômico obtido (dados não mostrados). De modo geral, foi observado um bom rendimento na extração, independente do tecido utilizado. Este rendimento foi ligeiramente superior para as brânquias (dados não mostrados). A avaliação do grau de integridade do DNA genômico extraído, conforme revelado pelo perfil eletroforético em gel de agarose, revelou a presença de DNA de alto peso molecular e confirmou a qualidade das amostras obtidas, independente do tecido utilizado (dados não mostrados).

Amostras do DNA genômico extraído dos três tecidos foram submetidas a um experimento piloto, utilizando o *kit* comercial de *Dot Blot* para o vírus IHHNV (DiagXotics, Inc.), enquanto para a PCR, foi realizado um experimento piloto com amostras obtidas de brânquias e pleópodes. Com base nesta avaliação preliminar, e considerando a quantidade de material obtido na extração, as amostras de brânquias foram utilizadas nos procedimentos subsequentes de *Dot Blot* e PCR.

A hibridização das amostras de DNA genômico, com a sonda específica para o IHHNV, marcada com digoxigenina (DIG), revelou, após incubação com o anticorpo anti-DIG, a presença de um precipitado corado de formato circular (*dot*) para algumas das amostras analisadas (Figura 1). A gama da coloração deste precipitado na membrana variou de rosa claro ao roxo, correspondente a hibridização da sonda específica com o DNA viral presente na amostra. Na ausência deste, a amostra foi considerada como livre do vírus IHHNV (amostra negativa). A cor e a intensidade das reações positivas das amostras foram avaliadas visualmente e comparadas com aquelas exibidas pelo controle positivo, incluído na mesma membrana. Estes parâmetros foram levados em consideração, como critério para

uma avaliação semi-quantitativa do material viral presente na amostra em questão.

A análise do produto amplificado por PCR, através da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (Figura 2), revelou a presença de uma única banda, correspondente a um fragmento de 512 pb. O tamanho deste fragmento está de acordo com aquele esperado, utilizando-se os iniciadores descritos. A presença deste fragmento indica que ocorreu a amplificação de uma seqüência específica do vírus IHHNV. Na ausência do fragmento de 512 pb, a amostra foi considerada negativa, ou seja, livre da infecção. Por outro lado, a pode ser observado que, quando presente, o fragmento de 512 pb, visualizado em gel de poliacrilamida (Figura 1), não apresentou a mesma intensidade em todas as amostras. A comparação entre o padrão de intensidade das bandas obtidas para algumas das amostras amplificadas por PCR e a cor do complexo imune na hibridização por *Dot Blot*, está mostrada na Figura 3.

Os resultados relativos à detecção do vírus IHHNV, através de PCR e *Dot Blot*, estão reunidos na Tabela 1. Foram analisados 129 animais por *Dot Blot*. Destes, 124 foram analisados também por PCR. A prevalência do IHHNV na população amostrada foi de 54,8% (58 animais positivos), conforme determinado pelas análises realizadas por PCR, e 65,1% (84 animais positivos), de acordo com as análises realizadas por *Dot Blot*.

Tabela 1

Prevalência do vírus IHHNV na população amostrada, através de PCR e *Dot Blot*. Os valores de prevalência estão expressos em %.

PREVALÊNCIA NA POPULAÇÃO				
METODOLOGIA	PCR	Número de camarões analisados	DOT BLOT	Número de camarões analisados
TOTAL	54,8%	124	65,1%	129

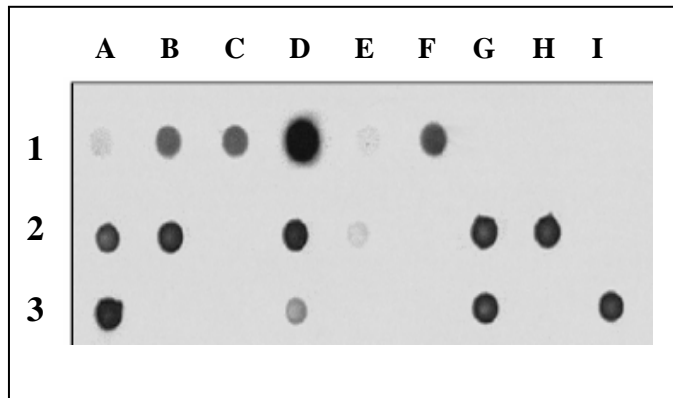


Figura 1: Membrana de nitrocelulose, mostrando reação de hibridização positiva, visualizada por método de detecção não-radioativa (reação colorimétrica). **1A - 1F;** **2A, 2B, 2D, 2E, 2G, 2H** - amostras positivas para o IHHNV; **1G - 1I, 2C, 2F, 2I** - amostras negativas para o IHHNV.

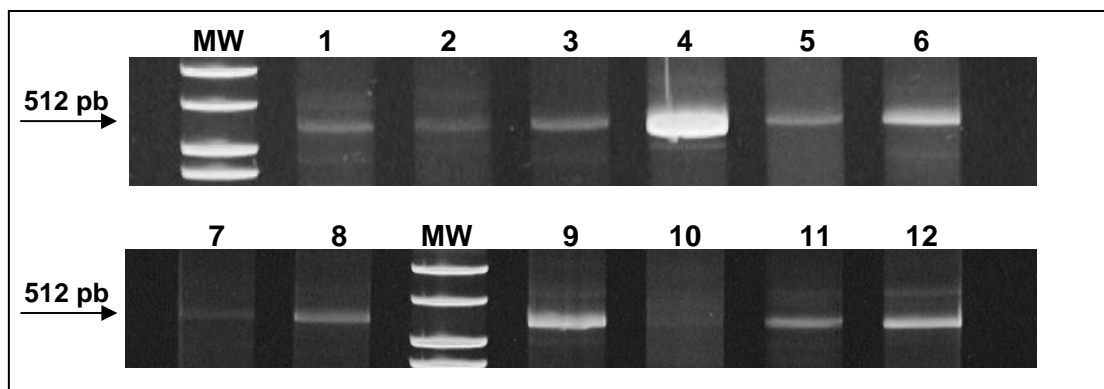


Figura 2: Produtos amplificados por PCR, visualizados em gel de poliacrilamida (PAGE, 8,4%). **MW** - marcador molecular; **1 - 12** - amostras positivas para o IHHNV (presença de uma banda, correspondente a um produto de 512 pb).

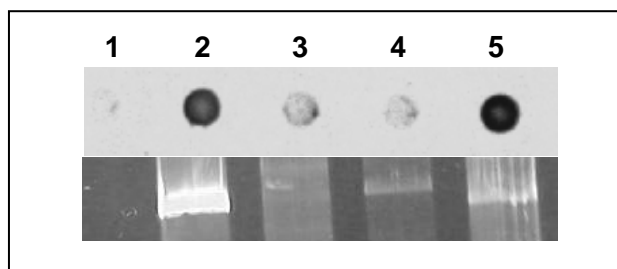


Figura 3: Comparação entre a intensidade dos híbridos no *Dot Blot* com as bandas amplificadas por PCR. **A1** - amostra positiva pelo *Dot Blot* e negativa pela PCR; **B2** - **B5** - amostras positivas para o IHHNV pelos dois métodos.

5. Discussão

Um fator importante que vem provocando perdas consideráveis na produção e produtividade nos cultivos mundiais é a ocorrência de doenças, associadas, muitas vezes a fatores ambientais e às técnicas de manejo (ROCH, 1999). É evidente que níveis inadequados de qualidade da água reduzem a resistência dos camarões a enfermidades e promovem condições para aumentar a abundância de organismos potencialmente patogênicos nos cultivos. Na carcinicultura, infecções virais são, freqüentemente, as mais devastadoras, já que são mais difíceis de serem diagnosticadas e não existem formas de tratamento após a infecção instalada (ROCH, 1999; BACHÈRE, 2000).

Para o monitoramento do estado de saúde dos animais cultivados, o diagnóstico de doenças deve ser constituído de um conjunto de observações de campo, aliadas a testes laboratoriais, uma vez que diferentes agentes etiológicos podem manifestar os mesmos sinais clínicos e síndromes, dificultando a exatidão do diagnóstico.

Segundo Roch (1999), as tecnologias baseadas em ácidos nucléicos, DNA e RNA, são potencialmente úteis para a identificação de vários tipos de patógenos. Estas tecnologias, ou métodos moleculares, têm sido utilizadas para a detecção de agentes virais em camarões peneídeos. Além da PCR, *Dot Blot* e hibridização *in situ* (ISH), mais recentemente, outros métodos têm sido igualmente aplicadas ao diagnóstico das enfermidades virais. Entre elas estão o sistema *miniarray* com detecção colorimétrica (BONAMI; RONAN, 2001; QUERE et al., 2002), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (HIZER et al., 2002) e correlação colorimétrica digital (ALVAREZ-BORREGO; CHAVEZ-SANCHEZ, 2001), utilizadas no caso de infecções provocadas pelo IHHNV.

No presente trabalho, duas metodologias, baseadas em métodos moleculares, foram aplicadas para monitorar a presença do vírus IHHNV em camarões *L vannamei* adultos.

As análises, visando a detecção do vírus IHHNV, foram realizadas através da amplificação da seqüência viral por PCR e através da hibridização das amostras com uma

sonda não-radioativa, utilizando um *kit* comercial para o vírus IHHNV. O monitoramento foi realizado em uma população de *Litopenaeus vannamei* constituída por 130 animais adultos reprodutores.

Os resultados de *Dot Blot* e PCR indicaram a presença do vírus IHHNV na população de *L. vannamei* amostrada. De acordo com os resultados obtidos pela reação de PCR, a prevalência do IHHNV nesta população foi de 54,8%. A PCR e as suas modificações tornaram-se a principal estratégia metodológica no diagnóstico clínico e na pesquisa médica (BERMINGHAM; LUETTICH, 2003). Na aquicultura, esta metodologia tem sido cada vez mais utilizada na detecção de patógenos e na pesquisa relacionada à patologia de organismos cultivados. Em camarões, esta metodologia tem sido aplicada tanto, no diagnóstico do IHHNV em, *L. vannamei* (LIGHTNER et al., 1994), quanto na detecção de outros vírus (TANG; LIGHTNER, 2000, 2001), e, ainda, na seleção de linhagens resistentes em *L. stylirostris* (TANG et al., 2000). Motte et al. (2003) estudaram, através desta metodologia, a transmissão vertical do IHHNV em *L. vannamei* e recomendam, no caso de uma alta prevalência do vírus em uma determinada população, a utilização da PCR como ferramenta de seleção de reprodutores não infectados.

A transmissão vertical pode ser o fator principal do aumento da prevalência do IHHNV de geração em geração, nos camarões cultivados. Motte et al. (2003), constataram que condições de estresse induzem a replicação do vírus. No caso de fêmeas induzidas à maturação, tais condições de estresse são provocadas pela ablação e pela desova. Além disso, no caso de fêmeas com alta infecção viral, os embriões de *L. vannamei* geralmente falham ao se desenvolver e eclodir (MOTTE et al., 2003), o que desencadeia perdas na produtividade dos cultivos.

As análises por *Dot Blot* mostraram uma prevalência do IHHNV igual a 65,1%, na população de *L. vannamei* utilizada neste estudo.

A diferença entre os valores de prevalência obtidos pelas duas metodologias empregadas pode ser explicada, em parte, devido às diferenças intrínsecas das duas técnicas, como por exemplo, o nível de sensibilidade. Sondas de ácidos nucleicos promovem resultados rápidos e são amplamente aplicadas em diagnósticos e detecção de agentes patogênicos (CARR et al., 1996; HASSON et al., 1999). Por outro lado, através da PCR quantidades pequenas, freqüentemente não detectáveis, de DNA podem ser amplificadas a partir de seqüências conhecidas do material genético de patógenos e a construção de iniciadores específicos para detecção do DNA destes organismos (FAO, 2002). Outra explicação para as discrepâncias entre os resultados obtidos na hibridização e no PCR, inclui a quantidade de material genômico utilizado para as análises. Para as ampliações, foi utilizado a mesma quantidade de DNA para todas as amostras, sendo padronizada a concentração de 10 ng/ μ L de material genômico extraído dos camarões. No caso do kit comercial foi padronizada a utilização do volume de 3 μ L de DNA ressuspenso em tampão TE 1x, conforme especificação do fabricante, o que poderia resultar em amostras com diferentes concentrações de material genômico.

Cabe salientar que resultados falso-negativos podem ocorrer na reação de PCR. Uma das razões para explicar este tipo de resultado está relacionada à presença de inibidores da reação. Uma das formas de se excluir esta possibilidade, pode ser a amplificação de uma seqüência alvo no DNA do hospedeiro. Neste trabalho, poder-se-ia amplificar uma seqüência correspondente a um gene constitutivo de *Litopenaeus vannamei*, como, por exemplo, o da enzima gliceraldeído -3-fosfato desidrogenase (GAPDH), como realizado por MACIEL (2002). A amplificação deste gene poderia, inclusive, ser utilizada para padronização de uma PCR semi-quantitativa para estimar o grau de infecção dos animais. Em se tratando de diagnóstico de rotina, seria interessante, ainda, incluir nas análises por PCR, DNA proveniente de animais SPF, como um controle negativo de contaminação nos procedimentos laboratoriais e da especificidade dos iniciadores utilizados. Além disso, poder-se-ia obter o padrão de digestão do fragmento amplificado de 512 pb, com enzimas de restrição, como critério adicional para sua caracterização.

Deve ser ressaltado que as condições da PCR para a detecção do IHHNV, padronizadas neste trabalho, devem ser comparadas àquela recomendada nos procedimentos da OIE, órgão de referência mundial para o diagnóstico de enfermidades de organismos aquáticos.

Por outro lado, alguns trabalhos, como aquele realizado por CARR et al. (1996), destacam a possibilidade de resultados falso-positivos, na utilização de hibridização com sondas não-radioativas. Este tipo de resultado pode ser decorrente, ou do tipo de tecido analisado, ou do excesso de sonda utilizada na hibridização. Estes fatores podem contribuir para a formação de um *background* sobre o suporte, o que dificulta a interpretação dos resultados, o que não foi observado no presente estudo.

No estudo de Carr et al. (1996), mencionado acima, a metodologia de hibridização com sondas genéticas foi utilizada para a seleção de linhagens livre de patógenos (SPF) para o IHHNV. A seleção destas linhagens é particularmente importante como garantia, para que os plantéis sejam iniciados com animais livres de patógenos. Segundo estes mesmo autores, comparado aos métodos tradicionais para detecção do IHHNV, como histopatologia, a rapidez no tempo de resposta, a facilidade de operação e o baixo custo envolvido estão entre as vantagens da utilização do *Dot blot*. Ao contrário de outros métodos de diagnóstico *in situ*, este método não requer o uso de equipamento histológico ou especialista. Desta forma, o uso desta metodologia seria recomendada para o monitoramento de rotina dos animais de cultivo, devendo, no entanto, estar associada a outras técnicas, como um monitoramento por PCR a intervalos regulares.

Contudo, a confiabilidade nos métodos moleculares utilizados, tanto em relação à amplificação pela reação em cadeia da polimerase quanto à hibridização pelo *Dot Blot*, dependem da habilidade de se extrair DNA em quantidade suficiente e de boa qualidade. Há vários métodos de purificação do DNA genômico, no entanto, ainda persistem problemas como contaminação, presença de inibidores da PCR e sensibilidade da molécula de DNA à

manipulação mecânica, fatores que facilitam sua quebra, conforme afirmam Coelho et al. (2004).

Ainda com relação aos altos valores de prevalência detectadas neste trabalho, deve-se destacar a ausência de sinais clínicos externos da doença. Isto sugere que o vírus é bem tolerado por *Litopenaeus vannamei*, conforme mostrado em diferentes estudos (MOTTE et al., 1996; CENAIM, 2004; FLEGEL et al., 2004). Por outro lado, nos cultivos, vários fatores podem promover estresse nos animais, fato que pode reduzir o seu estado imunológico, contribuindo para aumentar a susceptibilidade a infecções virais e o desenvolvimento de enfermidades. O estudo dos estressores ambientais sobre os camarões cultivados, tais como oxigênio dissolvido, densidade populacional, temperatura e compostos nitrogenados, e a constante melhoria nas condições de manejo deve ser intensificado. Este estudo, aliado à implantação de métodos rotineiros de diagnósticos para enfermidades virais são condições primordiais para produção de camarões marinhos peneídeos saudáveis.

Considerações Finais

Estudos envolvendo respostas bioquímicas, que reflitam o estresse causado nos organismos por fatores ambientais ou pela contaminação aquática ainda são pouco explorados, particularmente em camarões marinhos.

Alguns estudos têm destacado a relação entre o estabelecimento de enfermidades nos cultivos e a existência de um gatilho ambiental, causador de estresse. Esta observação mostra a relevância do presente estudo, o qual representa a etapa inicial de um projeto mais amplo, cujo objetivo é a investigação sistemática das respostas bioquímicas do camarão peneídeo, *Litopenaeus vannamei*, frente ao estresse, causado por diferentes fatores (químicos e físicos).

A proposta visa utilizar biomarcadores como ferramentas para avaliar a influência de parâmetros ambientais sobre a susceptibilidade a doenças, combinando a questão ambiental com a sanidade dos cultivos. Tais informações podem direcionar as medidas a serem adotadas nos cultivos, priorizando a qualidade ambiental e as técnicas de manejo, como ferramentas de caráter preventivo na manutenção da sanidade dos plantéis.

O presente estudo avaliou alguns biomarcadores em *Litopenaeus vannamei* exposto ao pesticida Carbofuran. Os resultados obtidos indicam que os biomarcadores apresentam um potencial promissor como ferramenta para o monitoramento dos cultivos.

Como perspectiva futura, sugerimos que estudos envolvendo a proteínas de estresse, HSP 70, sejam conduzidos em diferentes tecidos de *L. vannamei*, em um número maior de animais. Além disso, seria interessante relacionar os dados obtidos com a avaliação conjunta de outra proteína de estresse, a HSP 60. A imunocaracterização e a indução do citocromo P450, fundamental no processo de biotransformação de xenobióticos, devem ser também incluídas nas análises futuras, dado a escassez de estudos sobre esta

família de proteínas em crustáceos. Além disso, outras enzimas poderiam ser investigadas, visando avaliar de forma mais ampla as respostas ao estresse oxidativo nesta espécie de peneídeo. Estas análises devem complementar, ainda, eventuais variações sazonais e aquelas relacionadas ao sexo, fase de desenvolvimento e estágio de maturação gonadal.

Cabe salientar que experimentos envolvendo outros parâmetros importantes para os cultivos foram realizados paralelamente aos aqui descritos. Com base em informações sobre as condições reais dos cultivos, obtidas através do Laboratório de Camarões Marinhos, buscou-se avaliar, de forma isolada, alguns parâmetros considerados relevantes dentro de uma perspectiva de manejo: exposição à amônia (concentrações de 2 e 4 ppm), variação da densidade populacional e da temperatura dos tanques e, ainda, a depleção do oxigênio dissolvido. As análises relativas a estes parâmetros encontram-se em fase de finalização e poderão contribuir para a discussão dos dados apresentados neste trabalho.

Paralelamente a avaliação de biomarcadores, a padronização e a utilização de metodologias de diagnóstico de enfermidades, particularmente aquelas de etiologia viral, apresentam-se como uma prioridade para a carcinicultura. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização com sondas marcadas não-radioativamente representam ferramentas de fundamental importância no monitoramento dos cultivos, contribuindo para a valorização do camarão cultivado. Dado que o sistema imune de invertebrados não apresenta memória imunológica, as ações em relação às doenças em camarões cultivados devem ser baseadas na prevenção, fundamentada no monitoramento constante da presença de patógenos, através de diagnóstico laboratorial.

A prevalência natural do IHHNV na população testada está de acordo com o fato deste vírus ser considerado, atualmente, com um vírus cosmopolita, tendo se estabelecido em diferentes regiões desde o seu primeiro relato na década de 80, no Havaí. Mesmo não

estando mais este vírus na lista de notificação obrigatória da OIE, o mesmo deve ser monitorado nos cultivos como parte de uma estratégia constante e preventiva do estado de saúde dos animais.

Cabe ressaltar, ainda, que uma possível relação entre a presença do vírus, o grau de intensidade da infecção (através de PCR semi-quantitativa) e os biomarcadores avaliados poderá ser estabelecida, dentro da perspectiva de continuidade deste estudo. Desta forma, poder-se-á avaliar se presença do IHNV e/ou os níveis de infecção podem afetar a capacidade de resposta dos animais a contaminantes ou ao estresse causado por parâmetros ambientais adversos.

Referências

ALMILI, B.; et al. Effects of three fungicides alone and in combination on glutathione S transferase activity GST and cytochrome P450 (CYP 1A1) in the liver and gill of brown trout (*Salmo trutta*). **Mar. Environ. Res.** v. 54, p. 37-40, 2002.

ALMEIDA, G.R.; REYES; F.G.; RATH, S. *Drosophila melanogaster* Meigen: 3. Sensibilidade ao carbofuran e biomonitoramento de seus resíduos em repolho. **Quim. Nova**, v. 24, 768-772, 2001.

ÁLVAREZ, A.L. et al. Salinity stress test as a predictor of survival during growout in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 237, p. 237-249, 2004.

ALVAREZ-BORREGO, J.; CHAVEZ-SANCHEZ, M.C. Detection of IHHN virus in shrimp tissue by digital color correlation. **Aquaculture**, v. 194, p. 1-9, 2001.

ALVES, S.R.C. **Respostas bioquímicas em tilápias mantidas no Rio do Braço, Joinville, SC.** 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ANDREATTA, E.R; BELTRAME, E. Cultivo de camarões marinhos. In: POLI, CR.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.R.; BELTRAME, E. **Aqüicultura: Experiências brasileiras.** Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis, SC. 2004. 455 p.

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

BACHÈRE, E. et al. Shrimp Culture (Dossier). v.12, p 4 – 6, 1999.

BAINY, A.C.D. Biochemical responses in penaeids caused by contaminants. **Aquaculture**, v.191, p.163-168, 2000.

BATISTA, A. **Estudo da atividade hemolítica da hemolinfa do camarão-rosa *Penaeus paulensis* (CRUSTACEA: DECAPODA).** 1997. 53f Trabalho de conclusão de curso. Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

BERMINGHAM, N.; LUETTICH, K. Polymerase chain reaction and its application. **Current Diagnos. Pathol.**, v.9, p.159-164, 2003.

BOCQUENÉ, G.; ROIG, A.; FOURNIER, D. Cholinesterases from the common oyster (*Crassostrea gigas*): Evidence for the presence of a soluble acetylcholinesterase insensitive to organophosphate and carbamate inhibitors. **Fed. Eur. Bioch. Soc. Letters.** n. 00, p. 1-6, 1997.

BONAMI, J.R.; RONAN, Q. Detecção simultânea de múltiplos patógenos (WSSV y IHHNV). **Revista Aquatic**, 2001. <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=131>. Acesso em 31/01/2005.

BONAMI, J.R. et al. Purification and characterization of the infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus of penaeid shrimps. **J. Gen. Virol.** v. 71, p. 2657-2664, 1990.

BOND, J; BRADLEY, B. Heat-shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. **Mar. Environ. Res.**, v. 39, p. 209-212, 1995.

BOUTET, I.; et al. Molecular characterization and expression of the gene encoding aspartate aminotransferase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to environmental stressors. **Comp. Bioch. and Physiol. Part C** *in press*.

BOYD, C.E. **Water Quality in Warmwater Fish Ponds**. Auburn University, Alabama Agricultural Experiments Station, Auburn, EUA, 1979. 359 p.

BROWDY, C.L.; BRATVOLD, D. Preliminary developments of biosecure shrimp production system. Anais of U.S. Marine Shrimp Farming Program. The Oceanic Institute, Honolulu, EUA, p. 19-38, 1998.

BROCK, J.A.; LIGHTNER, D.V. Diseases of Crustacea. Diseases caused by microorganisms. In: KINNE, O. (Ed.) **Diseases of Marine Animals**. Biologische Anstalt Helgoland, Germany. 1990. 350 p.

CARR, W.H. et al. The use of an IHHNV gene probe serodiagnostic field kit for the screening of candidate specific pathogen-free *Penaeus vannamei* broodstock. **Aquaculture**, v. 147, p. 1-8, 1996.

CENAIM – CENTRO NACIONAL DE ACUICULTURA E INVESTIGACIONES MARINHAS. Boletim quinzenal. Disponível em <http://www.cenaim.espol.edu.ec>. Acesso em 31/01/2005.

CHIEN, Y.; PAN, C.; HUNTER, B. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. **J. Exp. Mar. Biol. and Eco.**, v. 297, p. 107-118, 2003.

CHU, K.H; LAU, P.Y. Effects of Diazinon, Malathion and Paraquat on the behavioral response of the shrimp *Metapenaeus ensis* to chemoattractants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.53, p. 127-133, 1994.

CIMINO, E.J.; et al. A newly developed ELISA showing the effect of environmental stress on levels of hsp86 in *Cherax quadricarinatus* and *Penaeus monodon*. **Comp. Bioch. Physiol.** v. 132, p-591-598, 2002.

COELHO, E.G.A. et al. Comparison between storage methods of DNA extracted from blood, semen and hair and between the techniques of extraction. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, p.111-115, 2004.

COMOGLIO, L.; et al. Evaluation of sublethal biomarkers in *Litopenaeus vannamei* on foodborne exposure to methyl parathion. **Ecotox. and Environ. Safe.**, In press.

COSTA, S.W.; ANDREATTA, E.R.; GRUMANN, A. **Programa Estadual para o Desenvolvimento do Cultivo de Camarões Marinhos**. Sec. Des. Rural e Agricultura/Epagri. 1999. 37 p.

DEOLINDO, P. **Caracterização de uma lectina parcialmente purificada da hemolinfa do camarão *Farfantepenaeus paulensis* (CRUSTACEA:DECAPODA)**. 2001. 65f. Trabalho de conclusão de curso. Curso de graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

ELLMAN, G.L.; et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.** v. 7, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA. **Cultivo do Arroz Irrigado no Brasil**. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br>. Acesso em 04 janeiro, 2005.

EXTOXNET – Extention Toxicology Network. Pesticide information profiles. Oregon State University, 1998. Disponível em: <http://ace.orst.edu/cgi-bin/mfs/01pips/carbofur.html>. Acesso em 22 setembro, 2004.

FAO - **DNA-based Molecular Diagnostic Technics**. FAO – Fisheries Technical Paper, n. 395, 2000.

FITZPATRICK, P.J. et al. Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of (*Mytilus edulis*) (L.), as potential organic pollution biomarkers. **Biomarkers**. v. 2, p. 51- 56, 1997.

FLEGEL, T.W. et al. Presence of multiple viruses in non-diseased, cultivated shrimp at harvest. **Aquaculture**. v. 240, p. 55-68, 2004.

FONSECA, C.; ROCHA, I.P. **Cartilha de Boas Práticas de manejo na Fazenda para Prevenir e Controlar Enfermidades do Camarão *Litopenaeus vannamei* no Brasil**. Associação Brasileira de Criadores de Camarão – ABCC. 2004. 28p.

FORGET, J.; BELIAEFF, B.; BOCQUENÉ, G. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic

contaminants. **Aqua. Toxicol.**, v. 62, p. 195-204, 2003.

GALINDO-REYES, J.G.; JASSO, A.M.; LIZARRAGA, C.V. Toxic effects of organochlorine pesticides on *Penaeus vannamei* shrimps in Sinaloa, Mexico. **Chemosphere**, v.33, p.567-575, 1996 a.

_____. Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. **Mar. Poll. Bul.** v.32, p.872-875, 1996 b.

GALINDO-REYES, J.G.; et al. Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaues vannamei* exposed to pesticides. **Chemosphere**, v.40, p.233-237, 2000.

GALLO, D. **Manual de Entomologia Agrícola**. Agronômica Ceres Editora, São Paulo, Brasil. 1988. 58p.

GONZALES, C.R.M.; BRADLEY, B.P. Are There Salinity Stress Proteins? **Mar. Envir. Research**. v. 19, p. 205-208, 1994.

GUTTERIDGE, J.M.C.; QUINLAN, G.J. Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins. **Bioch. et Biophys. Acta**, v.1156, p. 144-150, 1993.

HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Assays for differentiation of glutathione-S-transferase. **Meth. in Enzymol.** v. 77, p. 398-405, 1981.

HASSON, K.W. et al. The geographic distribution of Taura Syndrome Virus TSV in the Americas: determination by histopathology and in situ hybridization using TSV-specific cDNA probes. **Aquaculture**, v. 171, p. 13–26, 1999.

HERNANDÉZ, J.Z. **Manual PURINA de Bioseguridade no cultivo de camarões marinhos**. Agribands Purina México, México. 2000. 36p.

HIRATA, R.; DIAS, S.S.; ROSA, A.R. Detecção de inseticidas por bioensaio com *Drosophila melanogaster*. **Arq. Inst. Biol.**, v.69, p.97-102, 2002.

HIRATA, R.; SKORTZARU, B.; NARCISO, E.S. Avaliação da degradação de inseticidas, em função do ph, utilizando *drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática. **Arq. Inst. Biol.**, v.70, p.359-365, 2003.

HIZER, S.E. et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers as predictors of infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) resistance in shrimp (*Litopenaeus stylirostris*). **Genome**, v. 45, p. 1-7, 2002.

HOLMBLAD, T.; SODERHALL, K. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in crustacean, possible role in immunity. **Aquaculture**, v. 172, p. 111-123. 1999.

HOWARD, P.H. **A Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals**. Lewis Publishers, Michigan, USA. 1989. 230p.

HODGSON, E.; LEVI, P.E. Metabolism of toxicants: phase reactions. In: HODGSON, E.; LEVI, P.E. (Eds.) **Introduction to Biochemical Toxicology**. Appleton & Lange, Connecticut. 1994. 111 p.

HUANG, T.S.; LAW, J.H.; SODERHALL, K.. Purification and cDNA cloning of ferritin from hepatopancreas of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **Eur. J. Bioch.**, v.236, p. 450-456, 1996.

HUGGETT, J.R.; et al **Biomarkers: biochemical, physiological e histological markers of anthropogenic stress**. SETAC, Lewis Publishers, 1992. 347 p.

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

JSA – JOINT SUBCOMMITTEE ON AQUACULTURE. **An evaluation of potential shrimp virus impacts on cultured shrimp and on wild shrimp population in the Gulf of Mexico and Southeastern U.S. Atlantic Coastal Waters**, National Marine Fisheries Service, Washington, 1997.

KENISH, M.J. **Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution**. CRC Press, Boca Raton. 1997. 524 p.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **J. of Biol. Chem.** v. 251, p. 6183-6188, 1976.

KUHNEN, S. **Avaliação do uso das proteínas de estresse (HSP 70) como biomarcador de contaminação ambiental no mexilhão *Perna perna***. 2001. 70f. Tese de mestrado. Curso de Pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LAMELA, R.E.L.; COFFIGNY, R.S.; MARTÍNEZ, M. Actividad peroxidasa (POD) en juveniles del camarón *Litopenaeus schmitti*. **CIVA 2003**. p. 99-104. Disponível em: <http://www.civa2003.org>. Acesso em: 03 setembro, 2004.

LARINI, L. **Toxicologia**. Editora Manole, São Paulo, Brasil. 1997. 268p.

LE MOULLAC, G. et al. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 8, p. 621-629, 1998.

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

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Savier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, Brasil. 1991.

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

LIGHTNER, D. V. et al. **Development and application of genomic probes for use as diagnostic and research reagents for the Penaeid shrimp parvovirus IHHNV and HPV and the baculoviruses MBV and BP**. USMSFP 10th Anniversary Review, GCRL, Special publication. v.1, p. 59-85, 1994.

LIGHTNER, D.V. et al. Chronic toxicity and histopathological studies with Benlate[®], a commercial grade of benomyl, in *Penaeus vannamei* (Crustacea: decapoda) **Aquatic Toxicol.** v. 34, p. 105-118, 1996.

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

LIGHTNER, D. V. et al. **Status of the major virus diseases of concern to the shrimp farming industries of the Americas**. In: ALSTON, D.E; GREEN, B.W; CLIFFORD, H.C. (Eds.) IV Simposio Centroamericano de Acuicultura. p. 36-48, 1997.

LIGHTNER D.V. The penaeid shrimp viruses IHHNV and TSV: epizootiology, production impacts and role of international trade in their distribution in the Americas. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, v. 15, p. 579-601, 1996.

LIGHTNER, D. V. et al. New developments in penaeid virology: Application of biotechnology in research and disease diagnosis for shrimp viruses of concern in the Americas. In: FULKS, W.; MAIN, K.L. (Editors). **Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States**. The Oceanic Institute, Honolulu, EUA, p.233-253, 1992.

LIGHTNER, D. V. et al. Infeccions Myonecrosis (IMN): A new virus disease of *Litopenaeus vannamei*. **World Aquaculture Society**. Honolulu, Hawaii, USA. Abstract. Aquaculture 2004

Abstract. CD-Row. 2004.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. The Heat – Shock Proteins. **Annu. Ver. Gen.** v.22, p. 101 – 108, 1998.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Bioch. and Physiol. Part A.** v. 120, p. 43-49, 1998.

LU, F.C. **Basic toxicology: Fundamentals, target organs and risk assessment.** Taylor & Francis Ltda, Washington, USA. 1996. 80p.

LUND, S.A.; FULTON, M.H.; KEY, P.B. The sensitivity of grass shrimp, *Palaemonetes pugio*, embryos to organophosphate pesticide induced acetylcholinesterase inhibition. **Aquatic Toxicol.**, v. 48, p. 127-134, 2000.

MACIEL, M.L.T. **Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina.** 2002. 38f. Tese de mestrado. Curso de Pós-graduação em Aqüicultura. Universidade Federal de Santa Catarina.

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

MERCADO DA PESCA. Disponível em: <http://www.mercadodapesca.com.br>. Acesso em 04 de janeiro, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Departamento de Pesca e Aqüicultura-Brasília. Plataforma Tecnológica do Camarão Marinho Cultivado. MAPA/SARC/DPA, CNPq, ABCC.2001. 276 p

MONTERRAT, J.; BIANCHINI, A.; REBELO, M. Toxicity and anticholinesterase effects of formulated methyl parathion to the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) pre-exposed to sesamol. **Comp. Biochem. Physiol. Part C**, v.118, p 329-334. 1997.

MOTTE, E. et al. Prevention of IHHNV vertical transmission in the White shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.219, p. 57 – 70, 2003.

NASCIMENTO, I.A. Aquacultura marinha e ambiente: a busca de tecnologias limpas para um desenvolvimento sustentado. **Tecbahia**, v. 13, p. 44 – 67, 2000.

NASCIMENTO, I.A. et al. Stress protein accumulation as an indicator of impact by the

petroleum industry in Todos os Santos Bay, Brazil. **Aquatic Ecosys. Health and Manag.** v.1, p. 101-108, 1998.

NUNES, A..J.P. O Cultivo do Camarão *Litopenaeus vannamei* em Águas Oligohalinas. **Panorama Aqüic.**, julho/agosto 2001.

NUNES, A.J.P. ; MARTINS, P.C. Avaliando o estado de saúde dos camarões marinhos na engorda. **Panorama da Aqüic.**, julho/agosto, p. 23- 33. 2002.

NUNES, A.J.P.; MARTINS, P.C.; GESTEIRA, T.C.V. Carcinicultura ameaçada: Produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aqüic.**, maio/junho, p. 23- 33. 2004.

OIE – OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. Diagnostic Manual for Aquatic Animal Disease. Disponível em http://www.oie.int/eng/normes/en_amanual.htm. Acesso em 10 março, 2003.

PÉREZ-FARAFANTE, J.; KENSLE, B. Penaeoid and Sergestoid shrimps and prawns of the world. In: **Key of diagnoses for the families and genera. Museum National d'Histoire Naturelle**, Paris. 1997. 233 p

PETERSON, G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* Witch is more generally applicable. **Anal. Biochem.** v. 83, p. 346-356, 1977.

PEZZAROLO, L.M. et al. Evaluation of some hemto-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and fisiological stress. **Aquaculture**, v. 214, p. 19-33, 2002.

PIRES, K.; et al. Evaluation of some haemato-immunological parameters in the brown mussel *perna perna* experimentally exposed to diesel oil. In: VILLALBA, A.; REGUERA, B.; ROMALDE, J.L. & BEIRAS, R. (Eds.). **Molluscan Shellfish Safety**. Conselleria de Pesca da Xunta de Galicia and Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Santiago de Compostela, p. 581-592. 2003.

QUERE, R. et al. White spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus simultaneous diagnosis by miniarray system with colorimetry detection. **J. of Virol. Method.**, v. 105, p. 189-196, 2002.

REDDY, M.S.; RAO, K.V.R. Effects of sublethal concentrations of phosphamidon, methyl parathion, DDT, and lindane on tissue nitrogen metabolism in the penaeid prawn, *Metapenaeus monoceros* (Fabricius). **Ecotoxicol. and Environ. Safe.** v. 19, p. 47-54, 1990.

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

ROCHA, I.P. **A Indústria Brasileira do Camarão Cultivado**. Disponível em <http://www.mcraquacultura.com.br/arquivos/AIndustriaBrasileiraCamaraoCultivado.pdf> acesso em 05 janeiro, 2005.

ROUBACH, R. et al. Aquaculture in Brazil. **World Aquac.**, march, p.28 - 34, 2003.

SEIFFERT, W.Q. et al. O cultivo de camarões marinhos no Estado de Santa Catarina: resultados e perspectivas. 2000. Disponível em <http://www.lcm.ufsc.br/trabalho/index.html> acesso em 10 março, 2003.

ShEST - Shrimp Genome Project. Disponível em: <http://www.shrimp.ufscar.br>. Acesso em: 04 de janeiro, 2005.

SILVA, A.Z., ZANETTE, J., FERREIRA, J.F., GUZENSKI, J., MARQUES, M.R.F., BAINY, A.C.D. Effects of salinity on biomarker responses in (*Crassostrea rhizophorae*) (Mollusca, Bivalvia) exposed to diesel oil. **Ecotoxicol. Environ. Safe. In press.**

SNIESZKO, S. F., Disease of fishes and their control in the USA. In The Two Lakes. **Fifth Fishery Management Training Course Report**, Jansen, London, p. 55-66, 1973.

SNYDER, M.J.; MULDER, E.P. Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. **Aquatic Toxicol.** v. 55, p. 177-190, 2000.

SOUZA, J. Desempenho da Pesca e da Aqüicultura. In: **Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina**, Instituto CEPA/SC, p.150-153, 2000-2001.

SPARLING, D.V. et al. Blood changes in mallards exposed to with phosphorus. **Env. Toxic. And Chem.** v.17, p. 2521-2539, 1998.

STEGEMAN, J.J.; et al. **Biomarkers, Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. CRC Press, Florida, USA. 1992. 335 p.

STEPHENSON, R.R., CHOI,S.Y.; OLMOS-JERVZ, A. Determining the toxicity and hazard to fish of a rice insecticide. **Crop Protec.**, v. 3, p.151-165, 1984.

TANG, K.F.J. et al. Postlarvae and juveniles of a selected line of *Penaeus stylirostris* are resistant to infection hypodermal and hematopoietic necrosis virus infection. **Aquaculture**, v.190, p. 203 – 210, 2000.

TIMBRELL, J. **Introduction to Toxicology**. Taylor & Francis, New York, NY. 2002. 215 p

TSENG, I.; CHEN, J. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under nitrite stress. **Fish & Shellf. Immunol.** v. 17, p. 325-333, 2004.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMULEN, E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment – A review. **Environ. Toxicol. and Pharmacol.** v.13, p. 57-149, 2003.

WALKER, C.H. et al. **Principles of Ecotoxicology.** London, Taylor & Francis, 1996. 321p.

ZANETTE, J.; FREITAS, F.A.; FERREIRA, J.F.; GUZENSKI, J.; MARQUES, M.R.F.; BAINY, A.C.D. Análises bioquímicas em *Crassostrea rhizophorae* expostas e depuradas ao carbofuran em diferentes salinidades. In: VII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2002, Vitória, ES. **Livro de Resumos Ecotox.** v.1, p. 107, 2002.