



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
UNIDADE ACADÊMICA DE SERRA TALHADA  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUCINDA ANDRIELE DOS SANTOS BARRETO

***Vibrio parahaemolyticus* INATIVADO POR CALOR PODE MODULAR A  
ATIVIDADE DE FENOLOXIDASES NO HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO  
*Litopenaeus vannamei*?**

SERRA TALHADA

2020

LUCINDA ANDRIELE DOS SANTOS BARRETO

***Vibrio parahaemolyticus* INATIVADO POR CALOR PODE MODULAR A  
ATIVIDADE DE FENOLOXIDASES NO HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO  
*Litopenaeus vannamei*?**

Trabalho apresentado à banca examinadora da Universidade Federal Rural de Pernambuco- UAST como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Diego de Souza Buarque

SERRA TALHADA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na  
Publicação Universidade Federal Rural de  
Pernambuco Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B273v Barreto, Lucinda Andriele dos Santos  
Vibrio parahaemolyticus INATIVADO POR CALOR PODE MODULAR A ATIVIDADE DE  
FENOLOXIDASES NO HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO *Litopenaeus vannamei*? / Lucinda Andriele dos  
Santos Barreto. - 2020.  
37 f. : il.

Orientador: Diego de Souza Buarque.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Serra Talhada, 2020.

1. Fenoloxidasas. 2. Vibrio inativado. 3. *Litopenaeus vannamei*. I. Buarque, Diego de Souza, orient. II.  
Título

---

CDD 574

***Vibrio parahaemolyticus* INATIVADO POR CALOR PODE MODULAR A  
ATIVIDADE DE FENOLOXIDASES NO HEPATOPÂNCREAS DO CAMARÃO  
*Litopenaeus vannamei*?**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, como requisito obrigatório para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Presidente/Orientador)  
UFRPE/UAST

---

Dr. Thiago Barbosa Cahú (2º TITULAR)  
UFPE – Departamento de Bioquímica

---

Prof. Dr. Airton Torres Carvalho (3º TITULAR)  
UFRPE/UAST

SERRA TALHADA – PE

2020

Dedico este trabalho à minha avó Edisia Maria dos Santos, maior exemplo de referência em minha vida.

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso contou com a ajuda de diversas pessoas, dentre as quais agradeço:

Primeiramente a Deus pela minha vida e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

A minha avó Edisia Maria dos Santos, aos meus pais Carlinda Barreto e Francisco Barreto, bem como aos meus irmãos Daniele Barreto, Alex Barreto e Adriano Barreto e namorado Emanuel Gonçalves que me incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto me dedicava a realização do trabalho.

A todos os meus amigos do curso de graduação que compartilharam dos inúmeros desafios que enfrentamos, em especial Tatiane dos Santos Lima, que esteve presente em todos os momentos de dificuldade e aprendizado.

Ao professor Diego de Souza Buarque por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com dedicação.

À instituição de ensino Universidade Federal Rural de Pernambuco – UAST, essencial para o meu processo de formação profissional e por tudo que aprendi ao longo dos anos de curso.

Aos colaboradores do Laboratório de Enzimologia da Universidade Federal de Pernambuco e do Laboratório de Tecnologia em Aquicultura da UFRPE

- Depaq, pela estrutura para a realização de algumas etapas da monografia.

À Pós-graduação em Produção Vegetal da UFRPE/UAST pelo uso do espectrofotômetro, o qual permitiu a realização dos experimentos.

A todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desse trabalho.

## Resumo

A carcinicultura tem crescido muito nos últimos anos, com destaque no Brasil para o camarão *Litopenaeus vannamei*. Entretanto, doenças infecciosas representam uma grande ameaça para a produtividade, como a doença causada pela bactéria *Vibrio parahaemolyticus* que é responsável por grandes índices de mortalidade. Assim, algumas alternativas vêm sendo tomadas para entender a imunidade inata em camarões, como o efeito de bactérias inativadas para modular o sistema profenoxidase (proPO), que detecta a atividade das fenoxidases no hepatopâncreas do camarão. Portanto, o presente estudo tem por objetivo analisar o efeito do *V. parahaemolyticus* inativado nas enzimas fenoxidases de hepatopâncreas de *L. vannamei* e observar se a atividade dessas enzimas pode ser modulada mediante um segundo desafio com *V. parahaemolyticus* viva. O efeito do patógeno inativado seguido pela bactéria viva nas enzimas fenoxidases foram avaliados em extratos brutos de hepatopâncreas, nos seguintes tratamentos: (sem *V. parahaemolyticus* inativado (Controle), com *V. parahaemolyticus* inativado por calor, com *V. parahaemolyticus* vivo, com *V. parahaemolyticus* inativado por calor e *V. parahaemolyticus* vivo). As atividades foram mensuradas com incubação dos extratos brutos com L-DOPA (substrato inespecífico) e Hidroquinona (substrato específico de enzimas fenoxidases do tipo lacase) e inibidor das fenoxidases do tipo tirosinases (tropolona 13 mg/mL). Em seguida foi testado o efeito da temperatura (25°C - 85°C) na atividade das fenoxidases. A atividade enzimática do grupo *Vibrio* inativado seguido de infecção com o *Vibrio* vivo não foi significativa em relação ao grupo que tinha apenas o *Vibrio* vivo. Além disso, ocorreu modulação da atividade de forma negativa no grupo do *vibrio* vivo em relação ao grupo controle, determinando que o mesmo diminui a atividade das fenoxidases para se estabelecer no camarão. A atividade das fenoxidases foi levemente inibida (32,3%) por tropolona, indicando pouca presença das fenoxidases do tipo tirosinases. Além disso, as fenoxidases apresentaram termoestabilidade (atividade residual de aproximadamente 50% a 75°C), o que indica que as fenoxidases do tipo lacases podem estar presentes majoritariamente no hepatopâncreas de *L. vannamei*. Portanto, pode-se concluir que não ocorreu modulação da atividade das enzimas do tipo fenoxidases no hepatopâncreas com a inserção das bactérias patogênicas inativadas, nem que estas bactérias previnem o efeito de *V. parahaemolyticus* vivo nessas enzimas.

**Palavra-chave:** Fenoxidases, *Vibrio* inativado, *Litopenaeus vannamei*.

## Abstract

Carciniculture has grown in recent years, especially in Brazil for the shrimp *Litopenaeus vannamei*. However, infectious diseases represent a major threat to productivity, such as the disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*, which is responsible for high mortality rates. Thus, some alternatives have been taken to understand the innate immunity in shrimp, such as the system prophenoloxidase (proPO) that detects the activity of phenoloxidases in the hepatopancreas of shrimp, whose modulation is carried out by pathogens. Therefore, the present study aims to analyze the effect of inactivated *V. parahaemolyticus* on the *L. vannamei* hepatopancreas phenoloxidase enzymes and to observe whether the activity of these enzymes can be modulated through a second challenge with activated *V. parahaemolyticus*. The effect of inactivated pathogen followed by live bacteria in the phenoloxidase enzymes were evaluated in crude hepatopancreas extracts, in these treatments (without *V. parahaemolyticus* inactivated, with *V. parahaemolyticus* inactivated, with *V. parahaemolyticus* alive, with *V. parahaemolyticus* inactivated by heat and *V. parahaemolyticus* live). The activities were measured by incubating the crude extracts with L-dopa (non-specific substrate) and Hydroquinone (specific substrate of laccase phenoloxidase enzymes) and tyrosinase phenoloxidase inhibitor (13 mg / mL tropolone). Then the effect of temperature (25 ° C - 85 ° C) on the activity of phenoloxidases was tested. The enzymatic activity of the inactivated Vibrio group followed by infection with live Vibrio was not significant in relation to the live Vibrio group, just as there was a negative activity modulation in the live vibrio group, determining that it decreases the activity to establish itself in the shrimp. In addition, the activity was slightly inhibited (32.3%) by tropolone and the residual activity showed that laccase enzymes may be present marjoritly in the hepatopancreas of *L. vannamei*. This indicates that most of the phenoloxidase enzymes are laccase and that few enzymes are tyrosinase and that live pathogen is able to decrease enzyme activity in order to settle in the shrimp and cause an infection. Therefore, it can be concluded that neither phenoloxidase-like enzymes activity was not modulated in hepatopancreas following inactivated *V. parahaemolyticus* nor these bacteria prevent the effects of the active pathogen in these enzymes.

Keywords: Phenoloxidases, inactivated Vibrio, *Litopenaeus vannamei*



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), (Decapoda Penaeidae).....16
- Figura 2.** Ilustração do complexo sistema de defesa inato dos camarões sendo ativado pela desgranulação dos hemócitos devido ao reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos.....20
- Figura 3.** Efeito da temperatura na atividade das fenoloxidasas, presentes no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei*. A – Temperatura ótima para as fenoloxidasas. B – Estabilidade térmica para as fenoloxidasas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).....25
- Figura 4.** Efeito da temperatura na atividade das fenoloxidasas, presentes no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei*. A – Temperatura ótima para as fenoloxidasas. B – Estabilidade térmica para as fenoloxidasas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).....25
- Figura 5:** Determinação da atividade das enzimas do tipo fenoloxidase a partir de tratamentos obtidos do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* com *Vibrio parahaemolyticus*, como C – Controle; Vi – *V. parahaemolyticus* inativado; Va – *V. parahaemolyticus* ativo; ViVa – Desafio com *V. parahaemolyticus* inativado seguido de infecção com a bactéria ativa. Letras diferentes representam que a diferença entre os grupos é estatisticamente significativa (ANOVA de uma via seguido por Teste de Tukey).....27

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Inibição de enzimas do tipo fenoloxidasas no hepatopâncreas de *L. vannamei* por tropolona. Os valores são referentes à média de duplicatas de três extratos brutos contendo cinco hepatopâncreas cada. O grupo controle consistiu nos extratos brutos sem a presença do inibidor.....26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BG-**  $\beta$ -1,3-glicana

**LPS-** Lipopolissacarideo

**PG-** Peptidoglicano

**PMAP-** Padrões moleculares associados a patógenos

**PRP-** Proteínas de reconhecimento padrão

**ProPO-** Sistema Profenoloxidase

**PO-** Enzima fenoloxidase

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2. Referencial Teórico</b>	
2.1. Carcinicultura mundial e brasileira.....	14
2.2. Camarão <i>Litopenaeus vannamei</i> .....	15
2.3. Vibrioses em camarões.....	16
2.4. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	17
2.5. Sistema imune em camarões.....	18
2.6. Sistema de ativação das profenoloxidasas (proPO).....	19
2.7. Hepatopâncreas.....	21
<b>3. Objetivos</b>	
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	22
<b>4. Matérias e métodos</b>	
4.1. Cultivo e infecção de <i>L. vannamei</i> com <i>V. parahaemolyticus</i> .....	22
4.2. Preparação dos extratos brutos.....	23
4.3. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática.....	23
4.4. Determinação da inibição enzimática.....	23
4.5. Determinação do efeito do <i>V. parahaemolyticus</i> inativado na atividade de fenoloxidase.....	24
<b>5. Resultados</b>	
5.1. Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática.....	24
5.2. Determinação da inibição enzimática.....	26
5.3. Determinação do efeito do <i>V. parahaemolyticus</i> inativado na atividade de fenoloxidase.....	26
<b>6. Discussão.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>31</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>31</b>

## 1. Introdução

A introdução da espécie *Litopenaeus vannamei*, (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae), conhecida como camarão cinza ou camarão branco do pacífico, no início dos anos 80 revolucionou a carcinicultura marinha no Brasil (BARBIERI JUNIOR, OSTRENSKY NETO, 2002). A partir dessa década, o cultivo de camarões se tornou uma atividade importante e bastante rentável (BURGOS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). Em pouco tempo, *L. vannamei* demonstrou uma aclimatação bastante satisfatória, apresentando níveis de produtividade e competitividade muito superiores aos índices até então alcançados com as espécies cultivadas no Brasil (BARBIERI JUNIOR & OSTRENSKY NETO, 2002).

O declínio na carcinicultura, a partir do ano de 2004 gerou uma queda na produção e na produtividade (ROCHA, 2007). As causas apontadas para justificar esse declínio estão associadas a um desequilíbrio ambiental e a introdução de agentes potencialmente patogênicos nos sistemas de cultivo (COELHO *et al.*, 2016), como enfermidades virais e bacterianas (RODRIGUES, 2005).

Dentre as doenças bacterianas, destacam-se as vibrioses, as quais são causadas por bactérias patogênicas oportunistas do gênero *Vibrio*. Dentre as espécies de *Vibrio* prejudiciais a camarões, destaca-se *Vibrio parahaemolyticus*, uma bactéria marinha gram-negativa que é reconhecidamente um patógeno grave para vários organismos aquáticos (SOTO-RODRIGUEZ *et al.*, 2012) e que gera altas taxas de mortalidade em *L. vannamei* (BALASUNDARAM *et al.*, 2012).

Nos últimos anos, algumas medidas vêm sendo tomadas para tentar controlar a infecção de camarões cultivados por bactérias patogênicas, incluindo *V. parahaemolyticus*. Dentre estas medidas, o uso de antibióticos, não se mostrou eficaz, uma vez que as bactérias passaram a adquirir resistência aos mesmos (AL-OTHRUBI *et al.*, 2014).

Alternativas estão sendo pesquisadas para minimizar os efeitos das vibrioses, como o uso de bactérias inativadas como ferramentas para estimular o sistema imune dos camarões (POPE *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2013). Por meio do sistema imune inato os camarões desenvolvem resposta celular e humoral, sendo as bactérias inativadas capazes de desencadear resposta imune celular, como encapsulamento de patógenos e fagocitose (ROWLEY, POWELL, 2007). A partir do

conhecimento sobre a atuação do sistema imune inato para produzir defensores contra patógenos, tem sido demonstrado que os camarões podem desenvolver uma memória imune, amplificando a sua resposta imune mediante uma segunda infecção com o *Vibrio* inativado, também conhecido como vacina (KURTZ, 2005).

O uso das bactérias inativadas seria um dos principais fatores de desencadeamento da memória imune de camarões, onde elas apresentam influência no aumento do desempenho dos hemócitos, que representam um papel importante na resposta humoral (TASSANAKAJON *et al.*, 2013). Dentre as respostas induzidas nos hemócitos dos crustáceos tem-se os peptídeos microbianos, inibidores de proteases e a ativação do sistema das profenoloxidasas (proPO) (SILVEIRA *et al.*, 2016).

O sistema profenoloxidase (proPO) é ativado durante as reações imunológicas celulares, como formação de nódulos e capsulas. Nessas reações forma-se um precipitado fortemente escuro, denominado de melanina (SILVEIRA *et al.*, 2016). A enzima responsável pela produção da melanina é a fenoloxidase, que se encontra armazenada na forma inativa ou de profenoloxidase nos grânulos dos hemócitos. A proPO é ativada por clivagem proteolítica, mediada por serino proteases que também se encontra nos grânulos dos hemócitos. A degranulação dos hemócitos, com liberação da proPO e outros efetores imunológicos, é estimulada por padrões moleculares presente na superfície de microrganismos (NAPPI, OTTAVIANI, 2000). Uma vez liberada e ativada, a PO dá origem a uma cascata complexa de reações químicas que se inicia com a oxidação de compostos fenólicos e culmina na produção da melanina. Durante a cascata, formam-se vários compostos tóxicos como quinonas, que resultam na destruição e neutralização dos microrganismos invasores (COSTA *et al.*, 2008).

Apesar da importância dos hemócitos no sistema das profenoloxidasas, as enzimas desse sistema têm sido encontradas no hepatopâncreas, evidenciando que possivelmente este órgão possui funções digestivas e imunes (SILVEIRA *et al.*, 2018). Assim, pretende-se estudar o efeito de bactéria patogênica *V. parahaemolyticus* inativada por calor nas enzimas fenoloxidasas de hepatopâncreas de *L. vannamei* e observar se a atividade dessas enzimas pode ser modulada mediante um segundo desafio com *V. parahaemolyticus* viva.

## **2. Referencial Teórico**

### **2.1 Carcinicultura Mundial e brasileira**

A grande demanda do consumo mundial e a redução dos estoques pesqueiros naturais levou ao aumento do cultivo de animais aquáticos tais como, peixes, crustáceos (camarões) e moluscos (NATORY *et al.*, 2011). Neste contexto, a aquicultura teve um grande crescimento desde a década de 90, pois existe o aumento do consumo do pescado devido ao crescimento populacional e a procura por alimentos mais saudáveis e nutritivos (NATORY *et al.*, 2011). Acredita-se que essa atividade continuará em um crescimento notório nas próximas décadas (CABELLO, 2006).

No final dos anos 80 a produção do pescado estabilizou-se em 90 milhões de toneladas por ano, enquanto a produção da aquicultura aumentou de 16,5 milhões de toneladas por ano em 1989 para 106 milhões de toneladas por ano em 2015 (SIQUEIRA, 2018). Atualmente a aquicultura mundial já representa 46% do desembarque total de pescado e 52% de todo pescado é destinado ao consumo humano (CYRINO *et al.*, 2019).

Na aquicultura, um setor que também teve um elevado crescimento a partir da década de 90 foi o cultivo de camarões ou carcinicultura (TAHIM, DAMACENO, ARAÚJO, 2019). Esta atividade teve início no século XV no sudoeste asiático, porém somente na década de 30, no século XX, este cultivo tornou-se profissional (NATORY *et al.*, 2011). O cultivo de camarões cresceu bastante desde o início experimental, fornecendo milhares de empregos (LIGHTNER, REDMAN, 1998).

A carcinicultura possui maior rentabilidade nas costas tropicais da Ásia e da América latina que correspondem a 99,6% da produção mundial, com destaque para os países asiáticos que são os maiores produtores de camarões, produzindo cerca de 4,5 mil toneladas no ano de 2013, ficando com 85,1% da produção total. Dentre esses países, a China produziu (39,2%), Vietnã (14%), Tailândia (7,4%), Índia (6,5%). Já os países da América latina destacam-se com 14,5% da produção mundial, dentre eles o Equador (47,4%), o México (18,7%) e o Brasil com (10%) (TAHIM, DAMACENO, ARAÚJO, 2019).

A carcinicultura marinha no Brasil teve início na década de 1970, com a introdução da espécie *Marsupenaeus japonicus*, porém ela não se aclimatou ao ambiente do país (NATORY *et al.*, 2011). Logo a carcinicultura brasileira teve um

grande impulso no final da década de 80 com a introdução do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (PONTES, ARRUDA, 2005), que demonstrou alta adaptabilidade às condições climáticas do país, crescimento rápido e tolerância à salinidade (NATORY *et al.*, 2011). Assim a carcinicultura brasileira tornou-se uma das atividades mais importantes do setor pesqueiro para a economia nacional (PONTES, ARRUDA, 2005).

A produção de camarões marinhos no Brasil nos últimos anos vem crescendo consideravelmente, destacando a região Nordeste como o principal polo produtor, sendo responsável por 95% da produção nacional de camarões, por possuir um clima favorável durante todos os meses do ano (FONSECA *et al.*, 2009). Neste contexto, a espécie que teve destaque foi o camarão *L. vannamei* que se mostrou bem aclimatado às condições ambientais da região, possibilitando economicamente a atividade (MELO *et al.*, 2011).

## **2.2 Camarão *Litopenaeus vannamei***

O camarão *Litopenaeus vannamei*, também conhecido como camarão branco do Pacífico ou camarão cinza, está distribuído por toda a costa do Pacífico oriental, da América Central e do Sul, sendo uma das espécies mais importantes na carcinicultura mundial (LAI, CHENG, KUO, 2005). Este camarão é cultivado em temperaturas acima de 20° C, apresentando desenvolvimento satisfatório em regiões com clima tropical em temperaturas entre 28°C e 32°C. Já em baixas temperaturas, como regiões com clima temperado e subtropicais, o cultivo é fortemente afetado, pois há uma diminuição no crescimento, podendo causar mortalidade dos indivíduos (KRUMMENAUER *et al.*, 2011).

**Figura 1:** Camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) (Decapoda, Penaeidae).





Fonte: (SANTO FILHO, 2020)

### 2.3 Vibrioses em camarões

O cultivo de camarões em larga escala, causou o aumento da estocagem desses animais e conseqüentemente a incidência de doenças (REBOUÇAS *et al.*, 2011). Essas doenças são resultantes do desequilíbrio do organismo, do ambiente em que vivem e do patógeno. Assim com a ocorrência de alterações ambientais, o sistema de defesa do organismo é afetado deixando os camarões mais suscetíveis a patógenos (DOS FERNANDES VIEIRA *et al.*, 2009).

As enfermidades que mais acometem a carcinicultura são causadas por patógenos de origem viral e bacteriana (REBOUÇAS *et al.*, 2017). Dentre os patógenos bacterianos, os membros do gênero *Vibrio* totalizam mais de 100 espécies, que estão predominantemente associadas a uma variedade de habitats aquáticos, sobretudo marinhos, sendo exceção a essa regra as espécies *V. cholerae* e *V. mimicus* não-halofílicas, que podem ser encontradas em ambientes de água doce (KIM *et al.*, 2019).

As bactérias do gênero *Vibrio* são bactérias Gram negativas patogênicas e oportunistas encontradas na água, em sedimentos e na microbiota intestinal dos camarões sadios (REBOUÇAS *et al.*, 2017). Essas bactérias acometem os camarões quando os mesmos estão lesados, (GOMEZ-GIL *et al.*, 1998) afetando principalmente cultivos de camarões em fazendas e causando efeitos econômicos devastadores (SWAIN, SINGH, ARUL, 2009).

A disseminação de patógenos ocorre devido aos modernos sistemas de cultivo, que promovem condições favoráveis para o desenvolvimento desses microrganismos. Dentre essas condições é possível citar a alta densidade de confinamento dos camarões de cultivo e a não retirada dos indivíduos doentes da produção. (NATORY *et al.*, 2011).

Os vibrios acometem comumente os órgãos como hepatopâncreas, coração, órgão linfóide, cordão nervoso, glândula antenal e músculo. No camarão *Litopenaeus vannamei*, alguns vibrios como o *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio paranaeicida* causam sintomas como opacidade do corpo, necrose e letargia nos indivíduos (REBOUÇAS *et al.*, 2017). As espécies de patógenos oportunistas que mais causam mortalidade em larga escala são *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *Vibrio nigripulchritudo*. (REBOUÇAS *et al.*, 2017).

#### **2.4 *Vibrio parahaemolyticus***

O *V. parahaemolyticus* é uma bactéria patogênica gram negativa encontrada naturalmente em ambientes marinhos e costeiros e é frequentemente isolado de frutos do mar, como bacalhau, moluscos, polvo, caranguejo, lagosta e camarão (SU, LIU, 2007). O consumo de frutos do mar mal cozidos ou crus contaminados com o *vibrio* pode causar a doença gastroenterite aguda em humanos, sendo assim considerado um dos principais patógenos de frutos do mar no mundo (SU, LIU, 2007).

O *V. parahaemolyticus* está associado a infecções em organismos aquáticos (LOMELÍ-ORTEGA, MARTÍNEZ-DÍAZ, 2014), logo tem se mostrado patogênico para camarões peneídeos em várias partes do mundo. A patogenicidade dessa bactéria no camarão *L. vannamei* foi observada, pela primeira vez através de camarões doentes em cultivos na Índia em 2013 (REBOUÇAS *et al.*, 2017).

O *V. parahaemolyticus* é considerado o principal causador da síndrome da mortalidade precoce também conhecida como a doença da necrose hepatopancreática aguda (KUMAR *et al.*, 2014). Essa doença causa inflamação das células do hepatopâncreas, deixando o órgão atrofiado e pálido com manchas pretas causando letargia, exoesqueleto mole, crescimento baixo e estômago e intestino vazios devido a inflamação crônica (SAAVEDRA-OLIVOS *et al.*, 2018). A primeira morte de camarões causada por conta dessa doença foi na China em 2009, seguido de Vietnã em 2010, Malásia em 2011, Tailândia e Filipinas em 2012, chegando nas

Américas no ano de 2013 (SAAVEDRA-OLIVOS *et al.*, 2018). Assim, o entendimento do sistema imune dos camarões pode ajudar no combate ao *V. parahaemolyticus*.

## 2.5 Sistema imune em camarões

Animais invertebrados não possuem um sistema de defesa adaptativo ou adquirido como os vertebrados. Os camarões dependem de suas respostas imunológicas inatas, celulares e humorais, eficazes para combater microrganismos invasores (POPE *et al.*, 2011). As reações imunes celulares incluem fagocitose, modulação e encapsulamento, enquanto a humoral envolve a síntese e liberação de vários sistemas imunológicos como peptídeos antimicrobianos e inibidores de proteases (TASSANAKAJON *et al.*, 2013).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do hospedeiro contra bactérias, vírus e fungos (AI *et al.*, 2008). A presença de partículas estranhas na hemocele dos camarões provoca uma resposta imunológica iniciada através do reconhecimento das moléculas estranhas como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos (PG) derivados de paredes celulares de bactérias, e  $\beta$ -1,3-glicana ( $\beta$ G) derivada de fungos e micélios de levedura, as quais são identificadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) identificadas por moléculas de reconhecimento do hospedeiro (proteínas de reconhecimento de padrões – PRPs) (LEE; SÖDERHÄLL, 2002; YUDIATI *et al.*, 2016).

A imunidade adaptativa dos vertebrados reconhece e destrói patógenos e retorna, em seguida, a níveis basais. Quando ocorre uma segunda exposição ao mesmo patógeno, a resposta imune se torna mais rápida e efetiva em comparação à resposta mediante à primeira infecção (BREHÉLIN; ROCH, 2008; POWELL *et al.*, 2011). Até recentemente achava-se que esse mecanismo de resposta, chamado de memória imune, necessitava de células T e células B, No entanto, alguns estudos têm demonstrado que a memória imune pode ser também desencadeada no sistema imune inato, inclusive de invertebrados (NETEA; QUINTIN; VAN DE MEER, 2011; KUGELBERG, 2015).

Um método alternativo que vem sendo desenvolvido para o combate a infecções são o uso de bactérias inativadas, também conhecidas como vacinas putativas que ajudam a melhorar a resposta imune dos animais a patógenos. Então, tem sido mostrado que um segundo desafio com microrganismos aumenta o desempenho de hemócitos fagocitários, causando a destruição de invasores. Assim,

fica demonstrado que o uso de bactérias inativadas pode ser utilizado como ferramenta para estimular o sistema imune inato em camarões (POPE *et al.*, 2011).

Dentro do contexto apresentado, existe uma vacina comercial para invertebrados (AquaVac <sup>TM</sup> Vibromax <sup>TM</sup>), desenvolvida para proteger os camarões juvenis de uma variedade de espécies patogênicas de *Vibrio*. Esta vacina tem por finalidade aumentar a sobrevivência dos camarões após desafio com os patógenos (WONGTAVATCHAI; LÓPEZ-DÓRIGA; FRANCIS, 2010). Alguns estudos com camarões mostraram que os mesmos quando submetidos a patógenos, adquiriram resistência após a vacinação (TEUNISSEN *et al.*, 1998).

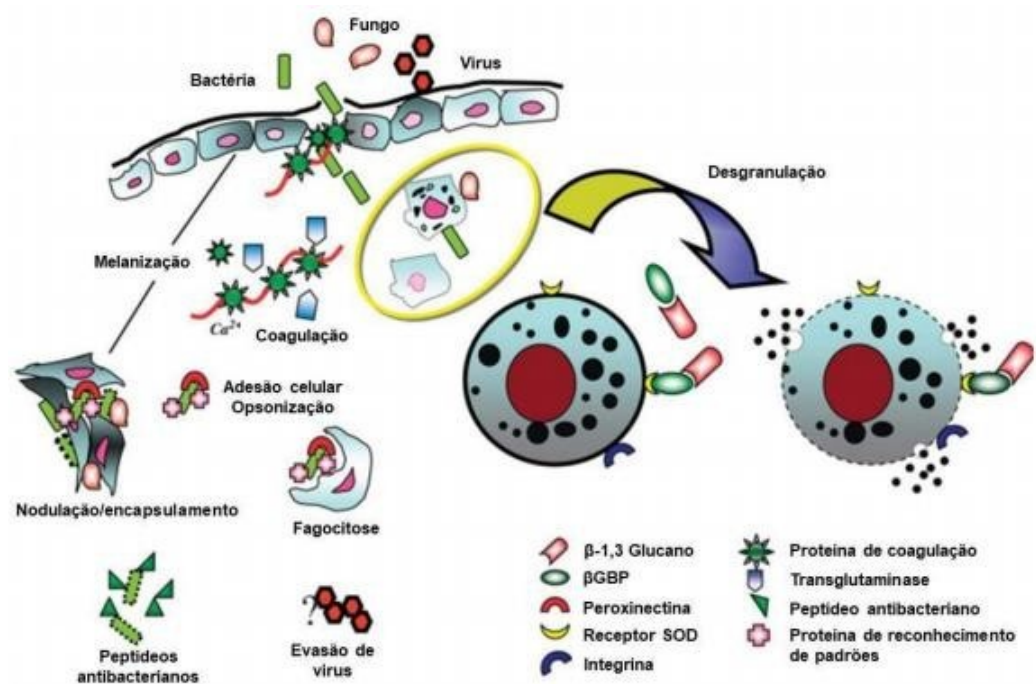
Até o momento, sabe-se que as principais respostas imunológicas ocorrem na hemolinfa por meio dos hemócitos, que armazenam moléculas imunes e são as principais células envolvidas na resposta imunitária, incluindo a atividade fagocítica e a ativação do sistema profenoloxidase (proPO) (JIRAVANICHPAISAL; LEE; SÖDERHÄLL, 2006; WU *et al.*, 2017). Os hemócitos podem ser classificados em 3 tipos, com base na presença de grânulos citoplasmáticos: células hialinas (HCs), células semi-granulares (SGC), e células granulares (GC) (TAYAG *et al.*, 2010). Nos crustáceos as células semi-granulares e granulares são induzidas à degranulação por moléculas microbianas ou estranhas como LPS,  $\beta$ G, e PG na presença de proteínas de reconhecimento de padrões específicos (PRPs), como por exemplo, as proteínas de ligação de  $\beta$ G (YEH *et al.*, 2010; YUDIATI *et al.*, 2016). As PRPs desencadeiam o sistema proPO, libertando proPO e outras proteínas (Figura 2).

## **2.6 Sistema de ativação da profenoloxidase (proPO)**

A forma ativa da profenoloxidase (proPO), é a enzima fenoloxidase (PO), enzima importante para o sistema de defesa dos invertebrados (LIU *et al.*, 2006). O termo fenoloxidase, geralmente é utilizado para se referir a três grupos enzimáticos diferentes envolvidas na oxidação de fenol na presença de oxigênio: catecol oxidases (EC 1.10.3.1), lacases (EC 1.10.3.2) e tirosinases (EC 1.14.18.1). A atividade dessas fenoloxidases corresponde à oxidação de monofenóis em o-difenóis e dos o-difenóis em o-quinonas, bem como a oxidação de *p*-difenóis em *p*-quinonas (Le Bris *et al.*, 2016). Em crustáceos, a enzima é encontrada na carapaça, exoesqueleto abdominal, cefalotórax, telson e pleópodos, bem como na hemolinfa, no músculo e no hepatopâncreas (OLIVEIRA, 2013).

As fenoloxidasas (PO) apresentam diversas funções fisiológicas, como esclerotização (endurecimento da carapaça) após a muda, cicatrização de lesões na cutícula e participa nas reações de defesa. Logo, a PO é a principal enzima que atua na produção de melanina (OLIVEIRA, 2013). Esta enzima encontra-se na forma inativa (proPO) nos grânulos de hemócitos de crustáceos. A proPO é ativada por clivagem proteolítica, mediada por serino proteases, que também estão armazenadas nos grânulos de hemócitos (NAPPI, OTTAVIANI, 2000). A degranulação dos hemócitos com a liberação da proPO é estimulada por proteínas de reconhecimento padrão, como  $\beta$ -glucanas, lipopolissacarídeos de bactérias Gram-negativas e peptídeos glicanos de bactérias gram-positivas. Uma vez que essa enzima é ativada e liberada, ela dá origem a uma série de reações complexas que se iniciam com a oxidação de compostos fenólicos e terminam com a produção da melanina. Durante essas reações são formados vários compostos intermediários, como quinonas e espécies reativas de oxigênio, que são tóxicos e resultam na destruição de microrganismos invasores (CEREUS, SÖDERHÄLL, 2004).

**Figura 2:** Ilustração do complexo sistema de defesa inato dos camarões sendo ativado pela degranulação dos hemócitos devido ao reconhecimento de padrões moleculares associados a agentes patogênicos.



FONTE: Jiravanichpaisal; Lee; Söderhäll (2006).

Os hemócitos desempenham um papel importante no sistema das profenoloxidasas. Entretanto, enzimas desse sistema têm sido encontradas no hepatopâncreas, evidenciando que possivelmente este órgão possui funções digestivas e imunes (SILVEIRA *et al.*, 2018).

## 2.7 Hepatopâncreas

O hepatopâncreas é o principal órgão digestivo em crustáceos (RÓSZER, 2014), sendo um órgão importante do camarão por apresentar funções semelhantes às do fígado, pâncreas e intestino nos vertebrados. Logo, este órgão é fundamental para o crescimento e sobrevivência dos camarões, servindo de modelo para avaliação da saúde e bem-estar dos mesmos (HU, LEUNG, 2007).

Além de ser responsável pelo sistema digestivo, o hepatopâncreas apresenta a função de desintoxicação e atua no sistema imune dos animais invertebrados, através de proteínas presentes no órgão que reconhecem moléculas presentes na superfície de patógenos, ativando o sistema de defesa do hospedeiro (HAN *et al.*, 2018); (JI, YAO, WANG, 2009). Descobertas recentes mostram que o hepatopâncreas em crustáceos é uma fonte importante de moléculas de imunidade inata (HUANG *et al.*, 2013). Alguns genes presentes no hepatopâncreas apresentam tanto funções digestivas quanto imunológicas, sendo modulados mediante infecções por diferentes patógenos (VELÁZQUEZ-LIZÁRRAGA *et al.*, 2019).

Uma doença denominada de necrose hepatopancreática aguda (AHPND) foi mostrada como sendo uma das principais causas da síndrome da mortalidade precoce. Essa doença é caracterizada por atrofia do hepatopâncreas do camarão, que causa descamação das células epiteliais (JOSHI *et al.*, 20014), tendo como principal causador dessa doença o *V. parahaemolyticus* (KUMAR *et al.*, 2014). Portanto, uma vez que *V. parahaemolyticus* causa prejuízos ao hepatopâncreas e que ele tem sido relacionado ao sistema imune, pretende-se estudar o efeito dessa bactéria patogênica em fenoloxidasas presentes no hepatopâncreas do camarão.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo geral

Estudar o efeito de bactéria patogênica *Vibrio parahaemolyticus* inativada por calor nas enzimas do tipo fenoloxidasas no hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus*

*vannamei* e observar se ocorre modulação da atividade dessas enzimas mediante uma segunda exposição com o *V. parahaemolyticus* vivo.

### 3.2 Objetivos específicos

1 - Determinar os efeitos da temperatura ótima nas fenoloxidasas de *L. vannamei*;

2–Caracterizar as enzimas do tipo fenoloxidasas por ensaios de inibição enzimática;

3 - Determinar a atividade de enzimas do tipo fenoloxidasas no camarão *Litopenaeus vannamei* mediante a administração de *V. parahaemolyticus* inativado e infecção com *V. parahaemolyticus* vivo;

4 – Determinar o efeito de *V. parahaemolyticus* inativado e infecção com *V. parahaemolyticus* vivo na sobrevivência de *L. vannamei*.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Cultivo e infecção de *L. vannamei* com *V. parahaemolyticus*

*L. vannamei* juvenis (12±1,5g) foram obtidos com a empresa Aquatec e transportados ao LTA/UFRPE (Laboratório de Tecnologia em Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco). Os camarões (15 camarões por grupo) foram mantidos em tanques com água marinha (23g.L<sup>-1</sup>) previamente filtrada e em contínua aeração. A temperatura média da água foi mantida entre 28°C e 29°C. Além disso, 25% da água dos tanques foi renovada diariamente.

Para os experimentos foram estabelecidos três grupos (três tanques por grupo), os quais receberam cloreto de sódio ou *V. parahaemolyticus* nos *pellets* da ração (quantidade de aproximadamente 8% da biomassa): Grupo controle (C), não foi exposto a bactérias em todo o experimento; Grupo Vi, recebendo *V. parahaemolyticus* inativado por calor (1 x 10<sup>6</sup> CFU/mL) por 7 dias seguido por manutenção nos tanques por 24 horas sem exposição à bactéria viva; Grupo Va, com manutenção nos tanques por 7 dias sem exposição à bactéria inativada, seguido por infecção por *V. parahaemolyticus* ativo (vivo) (1 x 10<sup>7</sup> CFU/mL) durante 24 horas e; Grupo ViVa, recebendo *V. parahaemolyticus* inativado por 7 dias seguido da bactéria ativa durante 24 horas. Para a inativação do *V. parahaemolyticus*, a bactéria foi autoclavada a 120°C por 20 minutos. Além disso, a sobrevivência dos camarões foi avaliada em

todos os grupos. Esta etapa foi realizada em parceria com o Dr. Janilson Félix, do Laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco.

#### **4.2 Preparação dos extratos brutos**

Após as etapas de cultivo e infecção dos camarões, eles foram anestesiados em gelo e os hepatopâncreas foram excisados. Então, os hepatopâncreas foram homogeneizados em NaCl 0,15 M a 4°C, na concentração 40 mg/mL. Em seguida, os extratos brutos foram obtidos a partir dos sobrenadantes após centrifugação a 10.000 x g por 25 minutos a 4°C para a remoção de débeis celulares e lipídeos. A proteína solúvel total foi determinada de acordo com Bradford (1976) utilizando albumina de soro bovino (BSA), como proteína padrão. Esta etapa foi realizada por colaboração com o Prof. Ranilson de Souza Bezerra, do Departamento de Bioquímica da UFPE.

#### **4.3 Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática**

O efeito da temperatura na atividade das fenoloxidasas do hepatopâncreas de *L. vannamei* foi analisado com temperaturas entre 25°C e 85°C. Para os experimentos de temperatura ótima, os extratos foram incubados com Tris-HCl, substratos L-DOPA e hidroquinona nas temperaturas descritas, em que a determinação das absorbâncias foi feita conforme descrito na determinação da atividade. Para a determinação da estabilidade térmica, apenas os extratos brutos foram previamente incubados nas temperaturas descritas acima. Em seguida, os mesmos foram colocados a 25°C e as absorbâncias e as atividades foram determinadas como descrito no tópico da determinação da atividade.

#### **4.4 Determinação da Inibição enzimática**

A determinação da inibição foi realizada por meio de diferentes grupos: controle (150 µL de tampão tris- HCl, 150 µL de extrato bruto e 300 µL de substrato L-DOPA (3 mg/mL) e inibição (100 µL de tampão tris-HCl, 50 µL do inibidor tropolona (3 e 13 mg/mL), 150 µL do extrato bruto e 300 µL (3 mg/mL) de substrato L-DOPA). Para tal, extrato, inibidor e tampão ficaram incubados na temperatura ambiente por 25 minutos. Em seguida, o substrato foi adicionado, ficando incubado por 40 minutos até a leitura da absorbância e determinação da atividade enzimática, conforme explicado no tópico



anterior. Os brancos também foram determinados como descrito acima. A quantificação da inibição foi determinada em percentual, considerando o grupo controle como 100%.

#### **4.5 Determinação do efeito de *V. parahaemolyticus* inativado na atividade das fenoloxidasas**

A determinação da atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas foi feita utilizando os extratos de hepatopâncreas do camarão *L. vanamei*, em diferentes tratamentos (C, Vi, Va, ViVa). A atividade foi determinada a partir da incubação desses extratos, onde foram utilizados 150 µL do tampão tris- HCL, 150 µL da extrato e 300 µL de L-DOPA (3 mg/mL), substrato para as enzimas do tipo fenoloxidasas, e com hidroquinona (3 mg/mL), substrato específico para lacases. Além disso, também foi feito um branco sem extrato e outro branco sem substrato.

A quantificação da atividade ocorreu durante 40 min, sendo realizada através do espectrofotômetro com absorbâncias de ( $A_{490nm}$ ) para L-DOPA e ( $A_{405nm}$ ) para hidroquinona. A atividade enzimática específica das fenoloxidasas foi expressa pela variação da absorbância por minuto e por miligramas de proteínas. A determinação da atividade foi feita de acordo com SÖDERHALL; CERENIUS, 1992.

Para os experimentos descritos acima, foram utilizadas três amostras biológicas para cada grupo, sendo feitas duplicatas para cada amostra. Os resultados são expressos em média  $\pm$  desvio padrão e análise estatística utilizada foi ANOVA de um fator seguida do teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

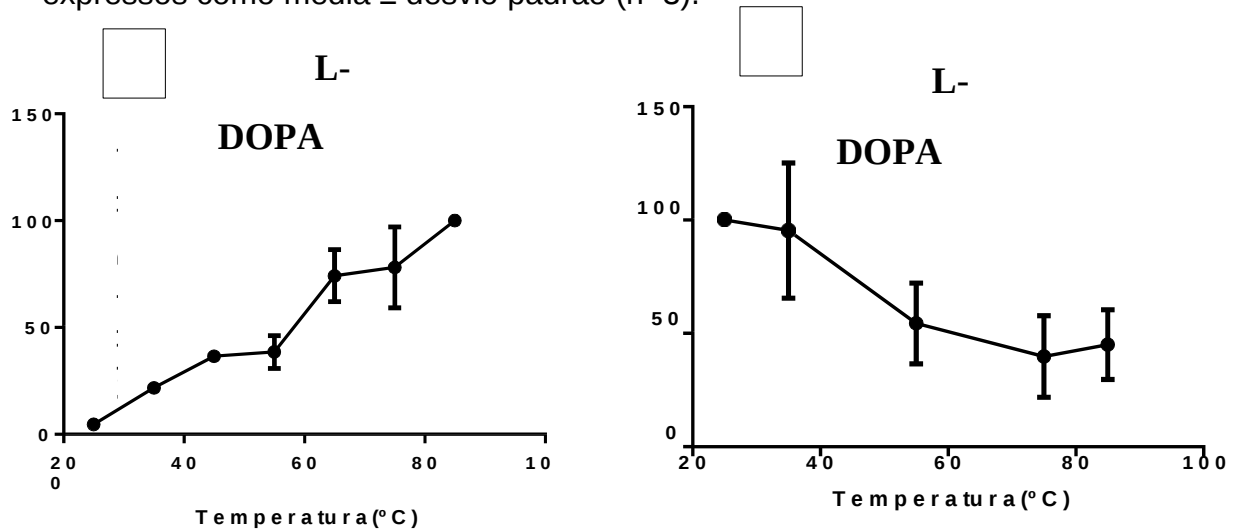
## **5. Resultados**

### **5.1 Determinação do efeito da temperatura na atividade enzimática**

Inicialmente, foi feita uma caracterização por parâmetros físico-químicos e por ação de inibidores nas fenoloxidasas, visto que é a primeira vez que a atividade dessas enzimas é detectada no hepatopâncreas de *L. vannamei*. Então, foi observado o efeito da temperatura na atividade das fenoloxidasas (Figura 3), mostrando uma

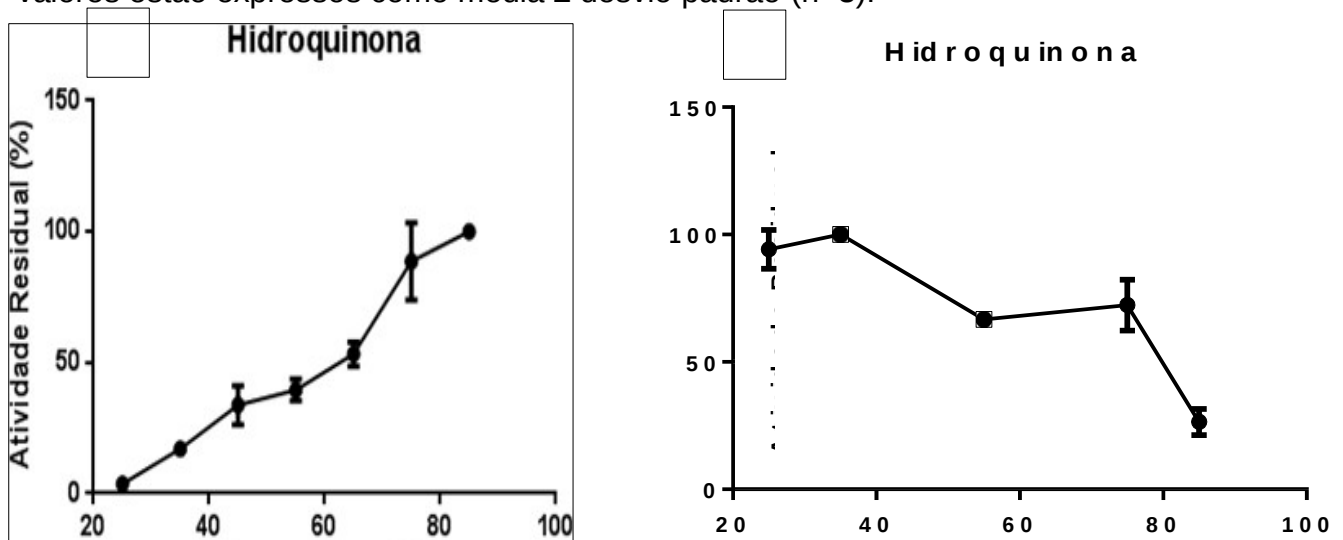
maior atividade dessas enzimas a 85°C (Figura 3A). Além disso, foi possível verificar que essas enzimas são termoestáveis, chegando a manter cerca de 50% da sua atividade entre 75°C e 85°C (Figura 3B).

**Figura 3.** Efeito da temperatura na atividade das fenoloxidasas, presentes no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei*. A – Temperatura ótima para as fenoloxidasas. B – Estabilidade térmica para as fenoloxidasas. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).



Em seguida, para verificou-se a temperatura ótima e a estabilidade térmica utilizando o substrato hidroquinona, o qual é específico para as fenoloxidasas do tipo lacases (Figura 4). Como foi possível observar, a temperatura ótima também foi de 85°C (Figura 4A) e essas enzimas também foram termoestáveis em elevadas temperaturas (Figura 4B). Isto indica que possivelmente as lacases são enzimas majoritárias dentre as fenoloxidasas presentes no hepatopâncreas de *L. vannamei*.

**Figura 4.** Efeito da temperatura na atividade das lacases, presentes no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei*. A – Temperatura ótima para as enzimas do tipo lacases. B – Estabilidade térmica para as enzimas do tipo lacases. Os valores estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).



## 5.2 Determinação da Inibição enzimática

Em seguida, foi feito um ensaio de inibição enzimática utilizando um inibidor de fenoloxidasas do tipo tirosinases (tropolona) nas concentrações de 3 e 13 mg/mL e mensurada a atividade com o substrato L-DOPA (Tabela 1). É possível observar que ocorreu inibição (32,3%) utilizando tropolona 13 mg/mL, enquanto que nenhuma inibição foi observada usando 3 mg/mL deste inibidor. A inibição de cerca de 30% da atividade enzimática somente com uma elevada concentração de inibidor mostra que as fenoloxidasas do tipo tirosinases são minoritárias dentre as fenoloxidasas presentes no hepatopâncreas de *L. vannamei*.

**Tabela 1.** Inibição de enzimas do tipo fenoloxidasas no hepatopâncreas de *L. vannamei* por tropolona. Os valores são referentes à média de duplicatas de três extratos brutos contendo cinco hepatopâncreas cada. O grupo controle consistiu nos extratos brutos sem a presença do inibidor.

Grupos	Inibição (%)
Controle	0
Tropolona 3 mg/mL	0
Tropolona 13 mg/mL	32,3

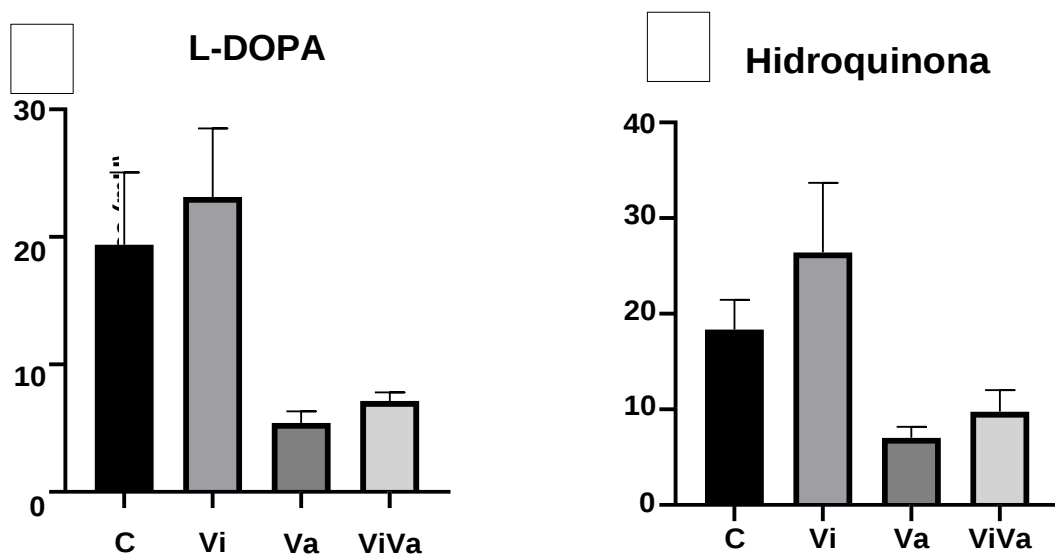
## 5.3 Determinação do efeito de *V. parahaemolyticus* inativado na atividade das fenoloxidasas

Uma vez que a caracterização realizada indica que as lacases podem ser as enzimas majoritárias dentre as fenoloxidasas no hepatopâncreas de *L. vannamei*, o efeito de *V. parahaemolyticus* inativado, foi avaliado com L-DOPA (para as fenoloxidasas totais) e hidroquinona (específico para as lacases) (Figura 5). Para tal, a determinação da atividade foi realizada em diferentes tratamentos com o *Vibrio parahaemolyticus*, a fim de verificar em quais grupos a atividade das enzimas são moduladas.

A partir dos resultados foi possível observar que as fenoloxidasas totais e as lacases apresentaram um perfil similar (Figura 5 A e B). A atividade dessas enzimas não foi modulada com a administração do *V. parahaemolyticus* inativado por calor,

visto que a atividade no grupo *Vibrio* inativado (grupo Vi) não mostrou-se significativo em relação a do grupo controle. Em seguida, pode-se verificar também que o patógeno vivo (grupo Va) foi capaz de diminuir significativamente a atividade das fenoloxidasas totais e das lacases em relação ao controle. Por fim, observa-se que o *Vibrio* inativado seguido de infecção da bactéria viva (grupo ViVa) não altera significativamente a atividade em relação ao grupo apenas com o *V. parahaemolyticus* vivo (Va), tanto utilizando o substrato L-DOPA quanto o substrato Hidroquinona. Portanto, *V. parahaemolyticus* inativado por calor não foi capaz de modular as fenoloxidasas nem de prevenir o efeito do patógeno ativo nessas enzimas. Além disso, também foi possível observar que não houve mortalidade nos camarões de todos os grupos testados.

**Figura 5:** Determinação da atividade das enzimas do tipo fenoloxidase a partir de tratamentos obtidos do hepatopâncreas do camarão *Litopenaeus vannamei* com *Vibrio parahaemolyticus*, como C – Controle; Vi – *V. parahaemolyticus* inativado; Va – *V. parahaemolyticus* ativo; ViVa – Desafio com *V. parahaemolyticus* inativado seguido de infecção com a bactéria ativa. Letras diferentes representam que a diferença entre os grupos é estatisticamente significativa (ANOVA de uma via seguido por Teste de Tukey).



## 6. Discussão

Esta é a primeira vez que a atividade de fenoloxidasas é descrita no hepatopâncreas de *L. vannamei*. Assim, faz-se necessária uma caracterização para

entender a possível composição e propriedades dessas enzimas, visto que a literatura tem mostrado que fenoloxidasas de diferentes organismos e em diferentes órgãos e tecidos podem variar bastante quanto à composição ou à atividade (LE BRIS *et al.*, 2016). Portanto, foi feita uma caracterização das fenoloxidasas quanto ao efeito da temperatura e à inibição antes de verificar a modulação de *V. parahaemolyticus* na atividade dessas enzimas.

A atividade das fenoloxidasas (totais e lacases) no hepatopâncreas de *L. vannamei* foi maior a 85°C. Além disso, essas enzimas foram termoestáveis a 75°C (Figuras 3 e 4). Semelhantemente, já foi demonstrado em outro estudo que lacases de organismos aquáticos podem ter estabilidade térmica em elevadas temperaturas (D'SOUZA-TICLO; SHARMA; RAGHUKUMAR, 2009). Neste contexto, MARTÍNEZ- ALVAREZ; MONTERO; GÓMEZ-GUILLÉN (2008) demonstraram que enzimas do tipo lacases do camarão *Parapenaeus longirostris* mantiveram cerca de 50% de sua atividade a 70°C. As fenoloxidasas totais e as enzimas do tipo lacases caracterizadas no nosso trabalho apresentaram um perfil similar, com considerável atividade a 75°C, isto indica que possivelmente as enzimas do tipo lacases são as fenoloxidasas presentes majoritariamente no hepatopâncreas de *L. vannamei*. Em concordância com estes resultados, as enzimas do tipo lacases apresentaram as mais elevadas atividades dentre as fenoloxidasas de *Penaeus monodon* (LE BRIS *et al.*, 2016).

Segundo os testes de inibição para a determinação das fenoloxidasas do tipo tirosinas o estudo de KAHN *et al.* (1985) mostrou que tirosinases têm alta inibição com tropolona, tratando-se do substrato L-DOPA, porém, isto não foi observado no nosso trabalho. A determinação da inibição enzimática no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei* (Tabela 1) mostrou que ocorreu inibição (32,3%) utilizando tropolona 13 mg/mL, enquanto as enzimas não foram inibidas com 3 mg/mL deste inibidor. Um baixo grau de inibição das fenoloxidasas do tipo tirosinases em uma concentração mais elevada do inibidor pode indicar que poucas fenoloxidasas presentes no hepatopâncreas de *L. vannamei* são do tipo tirosinases.

De fato, o estudo de ZHOU (2012) demonstrou que baixos níveis de expressão de tirosinases são encontrados em alguns órgãos de animais invertebrados. Assim, pode-se sugerir que uma baixa expressão gênica das tirosinases tem correlação com uma baixa produção e com pouca atividade dessas enzimas no hepatopâncreas de *L. vannamei*. Dentro deste contexto, as fenoloxidasas do tipo tirosinases estão presentes principalmente nos hemócitos de *L. vannamei* (LAI; CHENG; KUO, 2005). No entanto,

é possível que as tirosinases sejam importantes no hepatopâncreas, mesmo em pequenas concentrações, uma vez que essas enzimas são necessárias para catalisar reações que levam à melanização (SHI *et al.*, 2017). Uma vez que foi detectado que as lacases provavelmente são as principais fenoloxidasas no hepatopâncreas de *L. vannamei*, os efeitos de *V. parahaemolyticus* foram avaliados utilizando L-DOPA e hidroquinona.

Para avaliar os efeitos de *V. parahaemolyticus* inativado por calor, os camarões foram expostos ao patógeno inativado por sete dias. Este tempo foi necessário pois o termo “memória imune” representa uma resposta sustentada (BREHÉLIN; ROCH, 2008). Assim, estudos experimentais normalmente indicam que os efeitos relativos à memória imune são detectados entre 7 e 30 dias (CHANG *et al.*, 2018).

O único grupo capaz de alterar significativamente a atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas no hepatopâncreas de *L. vannamei* foi o *V. parahaemolyticus* ativo (Va), que diminuiu a atividade dessas enzimas em relação ao controle (Figura 5). De fato, isto parece ser importante para a manutenção desse patógeno dentro do camarão, visto que SHI *et al.* (2017) demonstraram que o silenciamento gênico de lacases em *L. vannamei* proporcionou um estabelecimento mais eficaz de *V. parahaemolyticus* no camarão. Essas alterações na atividade de moléculas do sistema imune de invertebrados podem flutuar de acordo com o tempo pós-infecção, visto que, em alguns momentos, o sistema imune do hospedeiro supera a infecção do patógeno. Já em outros momentos, os mecanismos moleculares do microrganismo promovem um escape para as defesas dos invertebrados (POPE *et al.*, 2011). Assim, estudos em outros tempos pós-infecção ajudarão a entender melhor esta relação.

Uma das formas pelas quais o *V. parahaemolyticus* poderia reduzir a atividade das fenoloxidasas seria induzir o camarão a produzir proteínas que inibam a ativação do sistema das fenoloxidasas (proPO). Isso impediria as fenoloxidasas de catalisarem os compostos fenólicos e desencadear a melanização e a formação de quinonas intermediárias para eliminação e encapsulamento de microrganismos invasores. De acordo com o exposto, NOOTHUAN (2017) caracterizou um inibidor da ativação da cascata das profenoloxidasas no camarão *Penaeus monodon*. Como camarões Peneídeos podem produzir inibidores do sistema proPO, existe a possibilidade do *V. parahaemolyticus* estar induzindo o *L. vannamei* a aumentar a produção desses inibidores para reduzir as defesas do camarão. No entanto, ainda são necessários outros experimentos para comprovar esta hipótese.

Por outro lado, a atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas não foi modulada por *V. parahaemolyticus* inativado por calor (Vi), e ele também não foi capaz de prevenir o efeito de Va na atividade dessas enzimas (ViVa). Isto pode estar relacionado ao procedimento utilizado para inativar *V. parahaemolyticus*. De acordo com Lin *et al.* (2013), *Vibrio* inativado por calor também não alterou moléculas imunes dos hemócitos de *L. vannamei* mediante uma segunda exposição a *V. alginolyticus* no tempo de sete dias. No entanto, a modulação de moléculas do sistema imune foi observada quando o *Vibrio* foi inativado por formalina. Segundo esses autores, a inativação por calor poderia desnaturar antígenos bacterianos e alterar a conformação de epítomos que seriam reconhecidos pelas células do hospedeiro. Além disso, é possível que ocorra um rompimento precoce da membrana bacteriana e a liberação de polissacarídeos, os quais também poderiam ser reconhecidos apenas no estágio inicial pós-desafio. Já a inativação por formalina mantém os polissacarídeos e os antígenos intactos, facilitando o reconhecimento do patógeno e o estímulo ao sistema imune do camarão.

Como base no exposto, é provável que a inativação de *V. parahaemolyticus* por formalina também estimule a atividade das fenoloxidasas no hepatopâncreas. Isto seria viável pois já está demonstrado que esse órgão apresenta proteínas de reconhecimento padrão (PRPs) (JI; YAO; WANG *et al.*, 2009). Os PRPs reconhecem os padrões moleculares patógeno-associados (PAMPs) do patógeno e, assim, desencadeiam a ativação do sistema de defesa do hospedeiro, incluindo a cascata das profenoloxidasas (ALVAREZ-LEE *et al.*, 2020). Neste caso, a inativação do patógeno por formalina poderia manter intactos os seus PAMPs, os quais seriam mais facilmente reconhecidos pelos PRPs do hepatopâncreas de *L. vannamei* em um estágio tardio pós-desafio. Esse corresponde ao tempo de avaliação da atividade das fenoloxidasas neste trabalho.

A ausência de modulação da atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas em quase todos os grupos testados possivelmente justifica a sobrevivência de 100% dos camarões. No entanto, é importante observar que no grupo infectado apenas com *V. parahaemolyticus* vivo também não houve mortalidade, mesmo com a diminuição significativa da atividade das enzimas. Provavelmente, os camarões utilizaram outras moléculas do sistema imune além das fenoloxidasas para combater infecções, como os peptídeos antimicrobianos (ALVAREZ-LEE *et al.*, 2020). De fato, *L. vannamei* utiliza um amplo arsenal de moléculas, as quais são moduladas diferencialmente

mediante infecção por *V. parahaemolyticus* (INTERAMINENSE *et al.*, 2019). Portanto, mesmo com a diminuição da atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas, é possível que outras moléculas tenham contribuído para o controle do patógeno, de forma a manter todos os camarões deste grupo vivos durante o experimento.

## 7. Conclusões

Pode-se concluir que dentre as enzimas do tipo fenoloxidasas, as lacases são possivelmente majoritárias e as tirosinases são minoritárias no hepatopâncreas do camarão *L. vannamei*. Além disso, *V. parahaemolyticus* vivo interferiu na modulação da atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas de forma negativa, diminuindo a sua eficácia a fim de se estabelecer no camarão. Por fim, pode-se concluir também que *V. parahaemolyticus* inativado por calor não foi capaz de modular a atividade das enzimas do tipo fenoloxidasas nem reverter o efeito do patógeno vivo na atividade dessas enzimas no hepatopâncreas de *L. vannamei*.

## 8. Referências

Al, Hua-Shui et al. Characterization of a prophenoloxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. **Fish & shellfish immunology**, v. 25, n. 1-2, p. 28-39, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.12.002>

AL-OTHRUBI, S. M. Y. et al. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from cockles and shrimp sea food marketed in Selangor, Malaysia. **Clin Microbiol**, v. 3, p. 148, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000148>

BALASUNDARAM, A. et al. Immunomodulation of vibrio-infected *Penaeus monodon*, subjected to probiotic feed supplementation. **Advanced BioTech**, v. 12, n. 7, p. 3-9, 2013.

BARBIERI, R. C. J.; OSTRENSKY, A. Camarões marinhos: engorda. **Aprenda Fácil, Viçosa**, 2002.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREHÉLIN, Michel; ROCH, Philippe. Specificity, learning and memory in the innate immune response. **Invertebrate Survival Journal**, v. 5, n. 2, p. 103-109, 2008.



BRIS, Cé dric Le et al. Melanosis in *Penaeus monodon*: Involvement of the Laccase-like Activity of Hemocyanin. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 3, p. 663-670, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04997>.

BURGOS-HERNÁNDEZ, Armando et al. In vitro studies of the effects of aflatoxin B1 and fumonisin B1 on trypsin-like and collagenase-like activity from the hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 250, n. 1-2, p. 399-410, 2005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.05.024> CABELLO, Felipe C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment.

**Environmental microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01054.x>

CERENIUS, Lage; SÖDERHÄLL, Kenneth. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological reviews**, v. 198, n. 1, p. 116-126, 2004 Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>

CHANG, Yu-Hsuan et al. What vaccination studies tell us about immunological memory within the innate immune system of cultured shrimp and crayfish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 80, p. 53-66, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.03.003>

COSTA, Andrezza Melo et al. Parâmetros hemato-imunológicos em camarões *Litopenaeus vannamei* durante o avanço da infecção pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV). 2008.

COELHO, Jaqueline da Rosa et al. Proteína hemocitária relacionada ao fibrinogênio (FREP) em camarões *Litopenaeus vannamei*: expressão gênica após desafios microbianos e durante o desenvolvimento larval. 2016.

CYRINO, José Eurico Possebon et al. Aquicultura, segurança alimentar e qualidade do. 2019.

DOS FERNANDES VIEIRA, Regine Helena Silva et al. Vibrioses em camarão cultivado. **Arquivos de Ciências do Mar**, v. 42, n. 1, p. 112-120, 2009.

D'Souza-Ticlo, D; Sharma, D; Raghukumar, C. (2009). A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. **Marine Biotechnology (NY)**, v. 11, n. 6, p. 725–737. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9187-0>

FONSECA, Sthelio Braga da et al. Cultivo do camarão marinho em água doce em diferentes densidades de estocagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44,

n. 10, p. 1352-1358, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009001000020>

GOMEZ-GIL, Bruno et al. Species of *Vibrio* isolated from hepatopancreas, haemolymph and digestive tract of a population of healthy juvenile *Penaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 163, n. 1-2, p. 1-9, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00162-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00162-8)

HAN, Si-yin et al. A comparative study on oxidative stress response in the hepatopancreas and midgut of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* under gradual changes to low or high pH environment. **Fish & shellfish immunology**, v. 76, p. 27- 34, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.001>

HU, Ke-Jin; LEUNG, Pak-Chow. Food digestion by cathepsin L and digestion-related rapid cell differentiation in shrimp hepatopancreas. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 1, p. 69-80, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.010>

INTERAMINENSE, Juliana A. et al. Effects of dietary *Bacillus subtilis* and *Shewanella algae* in expression profile of immune-related genes from hemolymph of *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & shellfish immunology**, v. 86, p. 253-259, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.11.051>

JI, Pei-Feng; YAO, Cui-Luan; WANG, Zhi-Yong. Immune response and gene expression in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hemocytes and hepatopancreas against some pathogen-associated molecular patterns. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 27, n. 4, p. 563-570, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.08.001>

JIRAVANICHPAISAL, Pikul; LEE, Bok Luel; SÖDERHÄLL, Kenneth. Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**, v. 211, n. 4, p. 213-236, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2005.10.015>

JOSHI, Jyoti et al. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). **Aquaculture**, v. 428, p. 297-302, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.030>

KAHN, Varda; ANDRAWIS, Andrawis. Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 905-908, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83150-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83150-7)

KIM, Kwang Il et al. Detection of *Vibrio* and ten *Vibrio* species in cage-cultured fish by multiplex polymerase chain reaction using house-keeping genes. **Aquaculture**, v. 506, p. 417-423, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.073>

KRUMMENAUER, Dariano et al. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, n. 5, p. 726-733, 2011.

KUELBERG, E. Macrophages: Controlling innate immune memory. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 596, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri3914>

KUMAR, Ballamoole Krishna et al. Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* associated with disease outbreak among cultured *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp) in India. **Aquaculture**, v. 433, p. 247-251, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.016>

KURTZ, Joachim. Specific memory within innate immune systems. **Trends in immunology**, v. 26, n. 4, p. 186-192, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2005.02.001>

LAI, Ching-Yi; CHENG, Winton; KUO, Ching-Ming. Molecular cloning and characterisation of prophenoloxidase from haemocytes of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & shellfish immunology**, v. 18, n. 5, p. 417-430, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.10.004>

LEE, So Young; SÖDERHÄLL, Kenneth. Early events in crustacean innate immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 12, n. 5, p. 421-437, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0420>

LIGHTNER, Donald V.; REDMAN, R. M. Shrimp diseases and current diagnostic methods. **Aquaculture**, v. 164, n. 1-4, p. 201-220, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00187-2)

LIN, Yong-Chin et al. Vaccination enhances early immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* after secondary exposure to *Vibrio alginolyticus*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69722, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069722>

LIU, Guangxing et al. Purification and characterization of phenoloxidase from crab *Charybdis japonica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 20, n. 1, p. 47-57, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.03.012>

LOMELÍ-ORTEGA, Carlos O.; MARTÍNEZ-DÍAZ, Sergio F. Phage therapy against *Vibrio parahaemolyticus* infection in the whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture**, v. 434, p. 208-211, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.08.018>

MARTÍNEZ-ALVAREZ, Oscar; MONTERO, Pilar; GÓMEZ-GUILLÉN, Carmen. Evidence of an active laccase-like enzyme in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v. 108, p. 624-632, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.029>

MELO, Ligia Maria Rodrigues de et al. Antibiotic resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from pond-reared *Litopenaeus vannamei* marketed in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1463-1469, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400032>

NAPPI, Anthony J.; OTTAVIANI, Enzo. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. **Bioessays**, v. 22, n. 5, p. 469-480, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(200005\)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(200005)22:5<469::AID-BIES9>3.0.CO;2-4)

NATORI, Mariene Miyoko et al. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. **Informações econômicas**, v. 41, n. 2, p. 61-73, 2011.

NETEA, M.G; QUINTIN J; VAN DER MEER. J.W, Trained immunity: a memory for innate host defense. **Cell Host Microbe**, v. 9, p. 355-361, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.04.006>

NOOTHUAN, Nattaphop; AMPARYUP, Piti; TASSANAKAJON, Anchalee. Melanization inhibition protein of *Penaeus monodon* acts as a negative regulator of the prophenoloxidase-activating system. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 72, p. 97-102, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.014>

OLIVEIRA, Lucivânia Assis de et al. Atividade da polifenoloxidase em camarão (*Litopenaeus vannamei*) submetido ao emprego do frio e atmosfera modificada. 2013.

PONTES, Cibele S.; ARRUDA, Maria de F. Comportamento de *Litopenaeus vannamei* (Boone)(Crustacea, Decapoda, Penaeidae) em função da oferta do alimento artificial nas fases clara e escura do período de 24 horas. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 648-652, 2005.

POPE, Edward C. et al. Enhanced cellular immunity in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after 'vaccination'. **Plos one**, v. 6, n. 6, p. e20960, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020960>

POWELL, Adam et al. Enhanced immune defences in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post-exposure to a vibrio vaccine. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 107, n. 2, p. 95-99, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.02.006>

REBOUÇAS, Rosa Helena et al. Antimicrobial resistance profile of Vibrio species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. **Environmental research**, v. 111, n. 1, p. 21-24, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.09.012>

REBOUÇAS, Rosa Helena et al. *Vibrio spp.* como patógenos na carcinicultura: alternativas de controle. 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/26098>

ROCHA, I. P. Panorama da Carcinicultura Brasileira em 2007: desempenho, desafios e oportunidades. **Panorama da Aqüicultura**, v. 17, n. 104, p. 26-31, 2007.

RODRIGUES, Josemar. Carcinicultura marinha desempenho em 2004. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de camarão (ABCC)**, v. 2, p. 38-44, 2005.

ROWLEY, Andrew F.; POWELL, Adam. Invertebrate immune systems—specific, quasi-specific, or nonspecific?. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 11, p. 7209- 7214, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7209>

SAAVEDRA-OLIVOS, Katherine Yuliana et al. Detección de una proteína asociada a la enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda (AHPND) en *Litopenaeus vannamei* bajo cultivo semi-intensivo en Ecuador. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 29, n. 1, p. 328-338, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i1.14194>

SANTOS FILHO, Luiz Gonzaga Alves dos et al. **Produtos naturais com potencial uso na carcinicultura e seus efeitos na imunoestimulação de *Litopenaeus vannamei* (BOONE, 1931)**. 2020

SHI, Lili et al. Biochemical and molecular characterization of a novel laccase from selective lignin-degrading white-rot fungus *Echinodontium taxodii* 2538. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1097-1106, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.028>

SHI, Lili et al. Identification and characterization of a laccase from *Litopenaeus vannamei* involved in anti-bacterial host defense. **Fish & shellfish immunology**, v. 66, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.026>

SILVEIRA, Amanda da Silva et al. Avaliação do perfil transcricional de genes potencialmente envolvidos na imunidade intestinal do camarão *Litopenaeus vannamei*. 2016.

SIQUEIRA, Tagore Villarim de. Aquicultura: a nova fronteira para produção de alimentos de forma sustentável. 2018.

SÖDERHÄLL, Kenneth; CERENIUS, Lage. Crustacean immunity. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 3-23, 1992. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90053-Z](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90053-Z)

SOTO-RODRIGUEZ, Sonia A. et al. Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the “Bright-red” Syndrome in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 109, n. 3, p. 307-317, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.01.006>

SWAIN, Sandip Madhusudan; SINGH, Chandrasekar; ARUL, Venkatesan. Inhibitory activity of probiotics *Streptococcus phocae* PI80 and *Enterococcus faecium* MC13 against vibriosis in shrimp *Penaeus monodon*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 4, p. 697-703, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9939-4>

SU, Yi-Cheng; LIU, Chengchu. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. **Food microbiology**, v. 24, n. 6, p. 549-558, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.005>

TAHIM, Elda Fontinele; DAMACENO, Marlene Nunes; ARAÚJO, Inácio Fernandes de. Trajetória Tecnológica e Sustentabilidade Ambiental na Cadeia de Produção da Carcinicultura no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 57, n. 1, p. 93-108, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790570106>

TASSANAKAJON, Anchalee et al. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. **Fish & shellfish immunology**, v. 34, n. 4, p. 954- 967, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.09.021>

TAYAG, Carina Miranda et al. Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish & shellfish**

**immunology**, v. 28, n. 5-6, p. 764-773, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.023>

TEUNISSEN, O. S. P. et al. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). **Aquaculture**, v. 164, n. 1- 4, p. 359-366, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00200-2)

VELÁZQUEZ-LIZÁRRAGA, Adrián E. et al. Transcriptomic analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone 1931) in response to acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. **PloS one**, v. 14, n. 8, p. e0220993, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220993>

WONGTAVATCHAI, J.; LÓPEZ-DÓRIGA, M. V.; FRANCIS, M. J. Effect of AquaVac™ Vibromax™ on size and health of post larva stage of Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei* and Black Tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 308, n. 3-4, p. 75-81, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.08.017>

YEH, Su-Tuen et al. The protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* that had been immersed in the hot-water extract of *Gracilaria tenuistipitata* and subjected to combined stresses of *Vibrio alginolyticus* injection and temperature change. **Fish & shellfish immunology**, v. 29, n. 2, p. 271-278, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.014>

YUDIATI, Ervia et al. Innate immune-stimulating and immune genes up-regulating activities of three types of alginate from *Sargassum siliquosum* in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 54, p. 46-53, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.03.022>

ZHOU, Zhi et al. The phenoloxidase activity and antibacterial function of a tyrosinase from scallop *Chlamys farreri*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 2, p. 375-381, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.022>