

Tecnologia do DNA na
busca de soluções

Revista do

GIA

Ano 1 número 2
Agosto 2006

DESVENDANDO UMA TRAGÉDIA NOS MANGUEZAIS BRASILEIROS



A Doença do Caranguejo Letárgico: o agente causador e sua forma de ação



**GRUPO INTEGRADO DE
AQUICULTURA E ESTUDOS
AMBIENTAIS**

Coordenação Geral:

Antonio Ostrensky. DSc

Walter A. Boeger, PhD

Equipe Técnica:

Marcio R. Pie, MSc

Vania Vicente. DSc

Débora Pestana da Silva, DSc

Luciana Patella, BSc

Raphael Orélis Ribeiro, BSc

Gisele Geraldine Castilho, BSc

Diogo Hungria, Acadêmico

Robson Ventura, MSc

Robert Pilchowski. MSc

Ubiratan T. da Silva, MSc

Leandro Ângelo, MSc

Bruno T. Boeger, Acadêmico

Técnicos do Governo do

Estado de Sergipe

Marcelo Acácio Chammas

Gustavo Zambrana Campoverde

Jorge Espírito Santo de Almeida.

Edição Eletrônica:

Bruno T. Boeger

Grupo Integrado de Aqüicultura
e Estudos Ambientais

R. dos Funcionários, 1540

Juvevê, Curitiba, PR

80.035-050

Fones: 41-3350-5634 (fax)

41-4063-8353

79-3246-0714.

wboeger@ufpr.br

ostrensky@ufpr.br

giasergipe@infonet.com.br

<http://gia.locaweb.com.br>



Fundação de pesquisas
Florestais

PROJETO:
Mortandade do caranguejo-uçá

OBJETIVOS

Identificar o agente patogênico da Doença
do Caranguejo Letárgico (DCL)

Avaliar a sua patogenicidade e responsabili-
dade pela DCL

Compreender como a DCL se expressa

Desenvolver método diagnóstico

Realizar análise epidemiológica no ambien-
te, e em animais nativos e introduzidos.



ÍNDICE



EDITORIAL	04
ACONTECEU.....	05
ENTREVISTA: GOV. JOÃO ALVES	07
O CARANGUEJO-UÇÁ PEDE SOCORRO...08	
CIÊNCIA E ESPECULAÇÃO.....	12
A TECNOLOGIA DO DNA A SERVIÇO DO MEIO AMBIENTE	14
O GRUPO INTEGRADO DE AQUICULTURA E ESTUDOS AMBIENTAIS.....	16
ELE VIVE NA LAMA MAS TEM SANGUE AZUL.....	18
É UM FUNGO SIM SENHOR.....	20
A DCL E A FÁBULA DO VÍRUS.....	22
A DCL NA MÍDIA.....	25
POR DENTRO E POR FORA DOS FUNGOS NEGROS DA DCL.....	26
COMO O FUNGO PROVACA A DOENÇA?...30	
MONTANDO O QUEBRA-CABEÇA.....	34
CARANGUEJO UÇÁ: PRODUÇÃO EM LABORATÓRIO.....	38
A GENÉTICA, A RECUPERAÇÃO E O MANEJO DO CARANGUEJO-UÇÁ NOS MAGUEZAIS DE SERGIPE.....	44
PROJETO CULTIMAR.....	46
O QUE FAZER AGORA?.....	48

Quando, em 2003, ficamos sabendo das mortandades que estavam afetando populações do caranguejo-uçá no Nordeste brasileiro, decidimos abraçar a causa de buscar a origem do problema.

Naquela época, havia uma total confusão de opiniões sobre o possível agente etiológico da enfermidade que estaria causando as mortandades. Alguns sugeriam que se tratava de uma enfermidade não infecciosa, provocada por produtos químicos, oriundos de diversas atividades humanas realizadas na região costeira, tais como resíduos do produto da fabricação do açúcar, do petróleo ou de químicos utilizados em cultivos de camarões. Outros afirmavam que a enfermidade seria infecciosa e acusavam vírus, bactérias, fungos e protistas como sendo seu agente infeccioso. Neste embate de especulações, chegou-se a se criar situações hilariantes, como o periódico que sugeriu que “clorofórmios fecais” fossem os agentes causadores da doença!

Nossa equipe esteve presente no seminário realizado em Canasvieiras, Bahia, em setembro de 2003, no qual se discutiu as mortandades. Em uma reunião subsequente, em Aracaju, o Governo de Sergipe demonstrou seu interesse em financiar um projeto cujo objetivo seria definir o agente causador da enfermidade que está assolando as populações de caranguejo-uçá e, por consequência, os manguezais nordestinos.

O contrato entre o GIA, a FUPEF e o Governo do Estado de Sergipe, via CODISE, foi assinado em 2004. Desde então, a equipe do Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais desvendou inúmeros aspectos desta enfermidade: a) comprovou sua natureza infecciosa; b) sua associação com um fungo negro do gênero *Exophiala*; c) que o fungo é capaz de provocar a morte de animais infectados em laboratório; d) desenvolveu protocolos moleculares, microbiológicos e histológicos de diagnose; e) realizou um estudo epidemiológico em manguezais do Estado de Sergipe. Os resultados deste trabalho, que contou com o envolvimento de profissionais de diversas especialidades, caracterizando um estudo verdadeiramente multidisciplinar, são apresentados nesta edição da Revista do GIA. Aqui, discutimos ainda possíveis soluções ou mecanismos mitigadores que possam acelerar o processo de recuperação das populações de caranguejo-uçá. Tal intervenção pode vir a ser fundamental para a manutenção de uma verdadeira e centenária tradição gastronômica, que foi gravemente prejudicada após quase uma década de sucessivos eventos de mortandade.. Estudos financiados pelo SEBRAE-SE, visando a definição do relacionamento entre as populações de caranguejo-uçá dos manguezais do estado de Sergipe, estudos financiados por diversas instituições sobre a reprodução artificial desta espécie e a experiência do GIA em programas socio-econômicos com populações litorâneas indicam o caminho a seguir.

ACONTECEU



Feira do Verde, Vitória, ES

Agosto de 2004

Um mês após o início dos trabalhos relativos ao projeto financiado pela CODISE, o governador João Alves, secretários de estado, representantes das comunidades de pescadores e marisqueiros, representantes das agências de meio ambiente estaduais e federais e a imprensa local foram apresentados aos primeiros resultados. Walter Boeger, utilizando pela primeira vez o nome Doença do Caranguejo Letárgico, indicou que as análises apontavam ser um fungo Ascomycota o responsável pela enfermidade que vinha assolando os manguezais do estado.

Junho de 2005

A convite da empresa El Paso, os pesquisadores Antonio Ostrensky e Walter Boeger realizaram palestras junto às comunidades de pescadores e marisqueiros

de Boipeba, São Francisco e Barra Grande, da Baía de Camamu e regiões vizinhas. Os resultados do projeto financiado pelo Governo do Estado de Sergipe foram apre-

sentados e foram discutidas medidas para auxiliar a recuperação dos manguezais prejudicados em mortandades ocorridas nos anos anteriores.

Setembro de 2005

Durante a Feira do Verde, realizada em Vitória (ES), pesquisadores do GIA realizaram palestras relacionadas ao caranguejo-uçá; participaram de debates sobre a Doença do Caranguejo Letárgico e sobre a produção de larvas do caranguejo em laboratório.

Novembro de 2005

Como parte dos estudos para elucidar a causa da **Doença do Caranguejo Letárgico**, o pesquisador Marcio Pie realizou coletas de material biológico nos principais sistemas estuarinos do Sergipe. Durante o período de coletas foram ainda concedidas entrevistas sobre a DCL a diversas emissoras, como a Globo (Bom Dia Sergipe, Jornal do Meio Dia) e o SBT. Foi também apresentada uma palestra à Associação de Catadores de Sergipe,



Barra Grande, Bahia

explicando o estado atual do conhecimento da doença e as pesquisas em andamento no GIA.

Janeiro de 2006

A pedido da prefeitura de São Mateus (ES), a equipe do LEMPE diagnostica a presença de DCL nos manguezais da região, através de múltiplos protocolos diagnósticos, incluindo o uso do marcador molecular. Os dados obtidos nessa ocasião serão fundamentais para a compreensão dos mecanismos de dispersão do fungo no litoral brasileiro.

Fevereiro de 2006

Durante o Congresso Brasileiro de Zoologia, que ocorreu em Londrina, Paraná, foram apresentados os seguintes trabalhos, consequência dos estudos realizados durante este projeto: “Avaliando a estruturação genética das populações do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), dos estados de Sergipe e do Paraná” e “Desenvolvimento de Marcador Molecular para o Causador da



Mortandade do “caranguejo-uçá” *Ucides cordatus* (Decapoda)”.

Mai de 2006

A convite da organização do 1º Congresso Brasileiro de Biologia Marinha, que ocorreu na Universidade Federal Fluminense, o pesquisador Walter Boeger, coordenador do projeto, apresentou uma palestra intitulada: “Doença do Caranguejo Letárgico: o que sabemos, o que fazer?”, na qual foram apresentados os resultados mais recen-

tes sobre o estudo financiado pelo governo do estado de Sergipe.

Junho de 2006

No programa “Em Tese”, da televisão universitária, da Universidade Federal do Paraná, o Prof. Walter Boeger foi entrevistado sobre a DCL, o conhecimento adquirido durante a execução do projeto e suas implicações sócioeconômicas para as comunidades de catadores do litoral brasileiro.



Barra de São Francisco, BA

Governador João Alves

Apesar da **Doença do Caranguejo Letárgico** estar causando mortandades intensas em manguezais de praticamente todo o Nordeste brasileiro desde 1997, não houve interesse do governo federal nem da maioria dos governos estaduais em fomentar pesquisas que permitissem, pelo menos, entender a origem e a dinâmica dessa enfermidade. É curioso que o maior interesse tenha surgido exatamente no menor estado nordestino: Sergipe. Graças ao interesse do Governador João Alves, o estado de Sergipe é hoje certamente o responsável pela produção da maior parte do conhecimento científico sobre a DCL internacionalmente. Nesta entrevista, o governador João Alves (GJA) responde a algumas perguntas feitas pela Revista do GIA (RG)

RG: Qual a sua visão sobre a importância do caranguejo-uçá para a cultura sergipana?

GJA: Cada estado da Federação abriga identidades e manifestações culturais particulares e dentre as sergipanas de destaque, figuram: o consumo e a retratação artesanal do caranguejo-uçá. Portanto, em Sergipe, ele teve seus horizontes ampliados e tornou-se um dos símbolos de identidade do estado.

RG: Sabemos que a abundância do caranguejo-uçá tem diminuído ao longo da costa brasileira, desde o Ceará até o

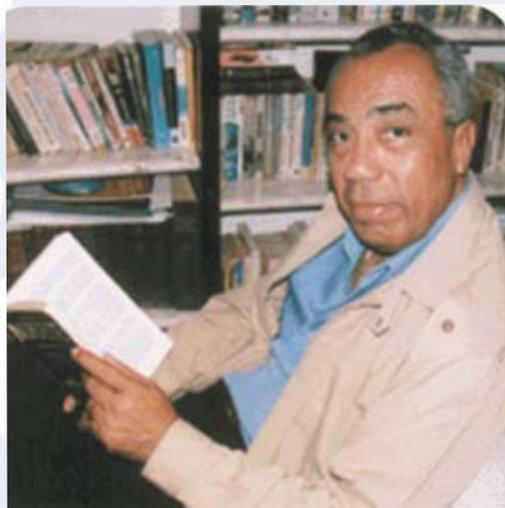
Espírito Santo. Contudo, somente o Estado de Sergipe têm financiado esforços para elucidar a origem desta mortandade. O que levou o Governo de Sergipe a investir nessa área?

GJA: O Governo de Sergipe tem forte compromisso com o setor primário e, em suas políticas, prioriza as atividades produtivas. Numa situação grave, como foi a da mortandade de caranguejos, é preciso ação e decisão. A sociedade não quer assistir seus

“EM SERGIPE, O CARANGUEJO TEVE SEUS HORIZONTES AMPLIADOS E TORNOU-SE UM DOS SÍMBOLOS DE IDENTIDADE DO ESTADO.”

governantes paralizados em debates infinitos. A despeito do nosso pequeno orçamento, não nos omitimos de investir mais de R\$ 350 mil na solução deste enigma, o que, sem dúvida, vai contribuir muito com nossos irmãos da Federação.

RG: Há uma previsão da am-



pliação dos estudos sobre o caranguejo-uçá?

GJA: Sempre que houver justificativas técnicas e perspectivas de avanços concretos, o Governo de Sergipe estará pronto para contribuir.

RG: Quais são outros projetos do Governo de Sergipe na área ambiental com impacto nas comunidades pesqueiras tradicionais?

GJA: A estruturação de atividades produtivas sustentáveis é um dos focos principais do Governo de Sergipe. Para tanto, concentramos grandes esforços no desenvolvimento do: zoneamento ecológico econômico do litoral de Sergipe; diagnóstico situacional e potencial da carcinicultura sergipana com vistas ao seu desenvolvimento sustentável; cálculo da capacidade de carga para carcinicultura dos seis complexos estuarinos de Sergipe e Código Ambiental do Estado de Sergipe. ●



O CARANGUEJO-UÇÁ PEDE SOCORRO

A cata do caranguejo-uçá é certamente uma atividade que remonta ao período pré-descobrimento. A população indígena das regiões litorâneas brasileiras já utilizava intensamente este recurso que, ao longo dos anos, foi incorporado na culinária de todos os estados brasileiros nos quais ocorrem. Além da destruição dos seus habitats naturais e da poluição aquática - na sua grande maioria, por esgotos domésticos - as populações do caranguejo-uçá vêm sendo submetidas à pressão de captura crescente. Inúmeras famílias, usualmente muito carentes, utilizam o recurso com fonte complementar ou exclusiva de renda. Essas famílias geralmente não têm condições de adquirir redes ou outros apetrechos que os permitam explorar outros recursos, ficando limitadas à catação de mariscos e caranguejos para sua sobrevivência.

Foi neste cenário que, por volta de 1997, um novo fator de risco tor-

nou-se visível, prejudicando ainda mais as populações do uçá do Nordeste brasileiro. Nos manguezais de Goiana, um município vizinho a Recife, caranguejos foram encontrados mortos e os moribundos apresentavam-se lentos, morrendo próximos de suas tocas. Biólogos e técnicos sugeriram, na época, que a mortandade seria causada por contaminação química, através da água ou do sedimento. Entretanto, mortandades semelhantes ocorreram subsequentemente em outras localidades e estados, em especial nos manguezais da Paraíba e de Sergipe. Desde então, eventos de mortandade têm expandindo sua distribuição em direção ao sul e ao norte (vide LINHA DO TEMPO). Na direção norte, as mortandades atingiram o Rio Grande do Norte e o Ceará, em 2000. Em 2003, mortandades semelhantes foram reportadas no Piauí. Nesses estados, nenhum outro registro foi feito deste então.

No sentido sul, as mortandades

ocorreram no litoral da Bahia, em 2001, dispersando rapidamente e atingindo os manguezais da Ilha de Tinharé, baía de Camamu, Caravelas e Mucuri. Em 2005, mortandades foram reportadas nos manguezais de São Mateus e, em 2006, em Vitória, no Espírito Santo.

Durante os eventos de mortandades, os caranguejos moribundos apresentam-se letárgicos, sem controle das pernas e quelas e sem equilíbrio. A morte ocorre, aparentemente, fora da toca e os caranguejos são encontrados com o cefalotórax virado para baixo. Em função desses sintomas, batizamos essa enfermidade de Doença do Caranguejo Letárgico (DCL). Aparentemente, nenhuma outra espécie de caranguejo ou de animal do mesmo ambiente é afetada pelas mortandades.

As conseqüências desses eventos de mortandade podem ser desastrosos. Há registros de redução de até 85% das capturas em

determinadas regiões. Em função dessas reduções de estoque, o preço do caranguejo no mercado acaba sendo multiplicado. A redução do recurso pode ser de tal ordem, que, para manter a oferta dessa tradicional iguaria, bares e restaurantes de todo o Nordeste estão importando o produto de manguezais do estado do Pará e Maranhão onde a DCL aparentemente não ocorre. Na baía de Camamu (BA), por exemplo, catadores que produziam cerca de 12 fiadas de caranguejos por dia ficaram limitados a cerca de 3 fiadas apenas. Alguns desistiram da atividade, buscando outras fontes de renda. Os catadores de maior sorte conseguiram associar-se a patrões, donos de barcos de pesca artesanal e passaram a exercer outras atividades relacionadas à pesca.

Técnicos do IBAMA e de agências ambientais dos estados afetados buscaram laboratórios e especialistas que pudessem deter-

minar os agentes responsáveis por estas mortandades nos manguezais brasileiros. Antes mesmo que especialistas da área biológica tivessem a oportunidade de avaliar e expor suas hipóteses, os órgãos ambientais passavam a apontar culpados pelos sucessivos eventos de mortandade de caranguejo, na maioria das vezes, sem nenhuma base técnica ou científica. A carcinicultura, por exemplo, foi e até continua sendo insistentemente acusada, devido à proximidade de viveiros de camarões e peixes com alguns manguezais nos quais a mortandade causada por DCL ocorreu.

Esta insegurança na identificação e o interesse no estudo do caranguejo-uçá levaram os pesquisadores do Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais (GIA) da Universidade Federal do Paraná a iniciar, em 2004, um projeto de pesquisas que objetiva definir

o agente causador da enfermidade, realizar experimentos que permitam satisfazer o Postulado de Koch (veja o artigo “Ciência ou Especulação”, a seguir), desenvolver métodos diagnósticos moleculares, e realizar um estudo epidemiológico preliminar nos estoques de caranguejos dos manguezais do Estado de Sergipe. O projeto é financiado pelo Governo do Estado de Sergipe, através de sua Companhia de Desenvolvimento Industrial e de Recursos Minerais (CODISE).

Coletas foram realizadas em diversos manguezais nos quais mortandades estavam ocorrendo tanto em Sergipe como na Bahia. Coletas em outros estados e localidades foram consideradas de fundamental importância para definição da identidade do promotor das mortandades nestes diversos locais

LINHA DO TEMPO DA DCL

Primeira evidência de mortandade causada pela DCL Recife, PE

Primeiro registro Paraíba

Primeiro registro Sergipe*

Primeiro registro Rio Grande do Norte*
Ceará

Primeiro registro Bahia*

Primeiro registro no Piauí

Começo dos trabalhos do GIA

Identificação do fungo como agente

Primeiro uso do nome DCL

Desenvolvimento do diagnóstico molecular

Primeiro registro Espírito Santo*

Comprovação experimental da patologia do agente



1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006

* estados para os quais a presença da DCL foi diagnosticada pelo GIA.

Localidade	Coordenadas	Data
Garapuá (BA)	13°28'26,1" 38°54'49,7"	03/jan/2004
Brejão (SE)	10°31'56,9" 36°29'27,1"	17/mai/2004
Brejão (SE)	10°32'14,7" 36°30'44,9"	19/mai/2004
Areia Branca (SE)	11°03'46,1" 37°08'17,8"	17-18/mai/2004
Crastro (SE)	11°25'02,2" 37°24'52,6"	19/mai/2004
Taiçoca de Fora (SE)	11°25'02,1" 37°24'52,7"	21/mai/2004
Caravelas (BA)	17° 42.595' 39° 18.256'	2-3/fev/2005

Localidades, coordenadas e datas de coletas durante eventos de mortalidade de caranguejo-uçá analisadas durante este estudo

(vide Tabela). Se a mortalidade fosse de origem não-infecciosa, os eventos poderiam ocorrer simultaneamente em locais e datas distintas. Existiam, todavia, fortes evidências de que a DCL teria origem biológica, infecciosa, especialmente considerando o padrão de dispersão a partir do primeiro caso em Pernambuco.

Após cerca de seis meses de estudos, a equipe do GIA concluiu uma análise histopatológica dos tecidos e órgãos de animais moribundos. Nessa parte do estudo, diversos organismos foram detectados nos tecidos dos caranguejos enfermos, sendo que apenas dois tipos de estruturas, na época denominadas de corpos ovais e cilíndricos, tinham correlação com o estado de saúde dos animais. Um mês após, estudos utilizando seqüências de DNA destes “corpos”, complementados por análises histológicas, histopatológicas e histoquímicas, além de estudos morfológicos em microscópio óptico e de microscopia eletrônica, era possível afirmar que o único organismo comum em todos os animais enfermos e em todas as localidades estudadas tratava-se de um fungo do filo

Ascomycota, um Pezizomycotina.

Em março de 2005 concluímos o seqüenciamento de genes nucleares, associados às regiões ITS e ao rDNA 5.8S desse fungo. Estes genes representam as seqüências mais comumente utilizadas na identificação de espécies de fungos. Assim, uma nova análise foi realizada, na tentativa de apresentar uma identificação molecular mais precisa do fungo associado à DCL. Baseado na comparação das seqüências disponíveis em um banco de dados de seqüências de todo o mundo, concluiu-se que este organismo era uma espécie do gênero *Exophiala*, idêntica ou muito próxima à *Exophiala salmonis*, um agente patogênico de animais de sangue frio amplamente conhecido em todo o mundo

Cepas deste fungo patogênico foram isoladas, identificadas molecularmente e encaminhadas ao Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsala, Holanda, para caracterização pelo Dr. Sybren de Hoog, um dos maiores especialistas em leveduras negras da atualidade. Uma análise preliminar do Dr Sybren, utilizando-se das se-

qüências produzidas em nossos laboratórios e seqüências produzidas por ele, de diversas outras espécies e cepas de fungos de animais de sangue frio, concluiu que a espécie de *Exophiala* que está associada à DCL é *Exophiala cf psychrophila*. A equipe do GIA e o Dr Sybren estão dando continuidade à resolução taxonômica do fungo da DCL, a qual deverá ser publicada em breve em revista científica internacional.

Conhecendo a identidade do fungo, a equipe do GIA concluiu, em junho de 2005 o desenvolvimento de marcadores moleculares que permitem não apenas a diagnose da enfermidade em caranguejos com sinais da DCL ou não (assintomáticos), mas ainda a prospecção desta espécie de fungo no meio ambiente. Estes marcadores foram posteriormente aplicados em um estudo epidemiológico em manguezais de Sergipe, na tentativa de estabelecer a dinâmica desta enfermidades no meio ambiente. A aplicação destes marcadores fornece subsídios que permitem propor hipóteses robustas sobre o recente aparecimento desta enfermidade nos manguezais brasileiros.

Este marcador foi aplicado a caranguejos coletados em diversas localidades do Nordeste e Sudeste brasileiro, confirmando a identidade única do agente patogênico. De Sergipe ao Espírito Santo, *E. psychrophila* estava presente durante e após eventos de mortalidades. As primeiras análises do projeto indicavam que as fases leveduriformes e de hifa desta espécie causavam patologias compatíveis com os sinais clínicos observados em caranguejos doentes.



Catador sergipano

Demonstravam ainda que quanto mais doentes estivessem os animais, maior era a quantidade de células leveduriformes e hifas presentes nos tecidos e órgãos dos animais.

A confirmação definitiva de que o fungo seria, de fato, o agente patogênico causador da DCL e, conseqüentemente, das mortandades observadas desde 1997, só seria possível e cientificamente aceita, com a realização de experimento de infecção experimental, o qual satisfaria os postulados de Koch (vide Artigo “Ciência ou Especulação”).

Animais saudáveis quando injetados com células de fungos cultivados em meio de cultura, morreram com sinais clínicos semelhantes aqueles observados em animais com DCL na natureza. O re-isolamento e aplicação do marcador molecular de *Exophiala psychrophila* dos animais experimentais que morreram, confirmaram a identidade do fungo. Desta forma, ficaram satisfeitos todos os postulados de Koch e é cientificamente correto afirmar que a DCL é provocada por uma cepa altamente patogênica de *Exophiala cf psy-*

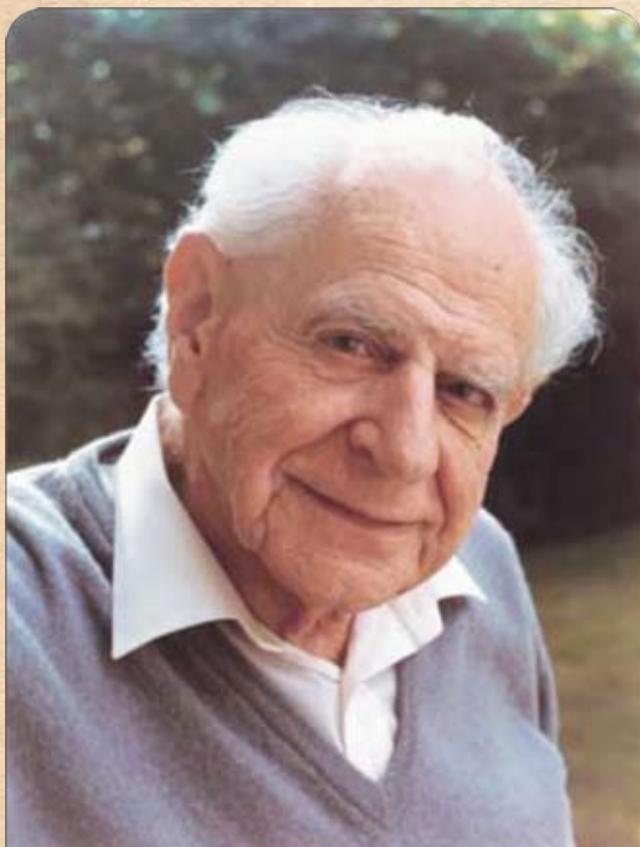
rophila.

Para que se possa estabelecer um programa de recuperação, conservação e manejo do caranguejo-uçá, seria imprescindível conhecer o relacionamento genético entre as populações dos manguezais sergipanos. É fundamental saber se as populações de cada estuário mantêm-se através de larvas oriundas da reprodução local ou se existe contribuição de larvas de outras populações de manguezais vizinhos. Assim, com o financiamento do SEBRAE-SE, foi realizado um estudo populacional utilizando-se técnicas de genética molecular conhecidas como RAPD e RFLP (vide Artigo “A genética, a recuperação e o manejo do caranguejo-uçá nos manguezais de Sergipe”). O resultado indica que as populações de caranguejo-uçá, mesmo separadas por dezenas de quilômetros, representam apenas subpopulações de uma unidade maior, composta por todos os manguezais sergipanos. Conforme estes resultados, existe um grande intercâmbio de larvas entre estes manguezais e, provavelmente, com man-

guezais dos estados vizinhos. Este resultado é fundamental para o delineamento de futuras estratégias de recuperação dos manguezais afetados.

A solução para o problema, todavia, não é simples. A DCL continua se dispersando, especialmente para o sul, tendo sido diagnosticada pelo GIA no estado do Espírito Santo no final de 2005. A contenção da dispersão é praticamente impossível e tratamentos de animais infectados no meio ambiente impraticável. Medidas mitigadoras nas regiões afetadas deverão incluir esforços técnicos de recuperação das populações de uçá através, por exemplo, da produção de animais geneticamente resistentes, através de programas de repovoamento, ações ambientais, sociais e econômicas, que tragam efetivamente soluções regionais para a perda da fonte de renda das populações de marisqueiros. Um programa de manejo e conservação de médio e longo prazo deste importante recurso marinho é, ainda, fundamental. ●

CIÊNCIA OU ESPECULAÇÃO?



Karl Popper, um dos principais filósofos da ciência do século XX

Os frutos do desenvolvimento científico são cada vez mais evidentes em nosso dia-a-dia. De fornos de microondas à clonagem de ovelhas, pode-se notar que a ciência tem avançado consideravelmente em suas diversas áreas. Qual seria a razão desse sucesso?

Como disse o físico Sir John Polkinghorne, o sucesso da ciência é comprado pela modéstia de suas ambições. Ao contrário do que muitos pensam, há muitas limitações no que a ciência pode responder. Talvez o critério mais importante do que é ou não científico é a falseabilidade,

formulado por Karl Popper.

O que é falseabilidade? Basicamente, uma teoria científica precisa fazer previsões e essas previsões precisam ser passíveis de serem testadas. Um dos exemplos mais importantes do desenvolvimento do método científico se deu justamente no estudo de doenças. Para que um agente (bactéria, fungo, vírus, etc.) seja considerado a causa de uma doença, vários critérios precisam ser atendidos. Esses critérios são comumente conhecidos como os “postulados de Koch”, depois que Robert Koch os usou para demonstrar que a tuberculose era causada por uma bactéria no século XIX (vide Quadro 1).

O principal avanço resultante da introdução dos postulados de Koch foi a disponibilidade de uma série de critérios objetivos e falseáveis para determinar se um agente causa uma dada enfermidade. Por exemplo, se alguém propõe que um agente (ex.: vírus) é o causador de uma doença, um pesquisador interessado em demonstrar essa causa necessita demonstrar todos os quatro postulados de Koch. Por outro lado, simplesmente afirmar que um agente causa uma doença sem apresentar dado algum é simplesmente uma especulação, e não representa uma teoria científica.

No caso da Doença do Caranguejo Letárgico, inúmeros agentes foram sugeridos como os causadores da enfermidade (vírus, bactérias, poluição, etc.). Apesar de que algumas destas propostas terem sido apresentadas por cientistas, elas quase invariavelmente eram desprovidas de evidências que as confirmassem. Como o leitor deve imaginar, propostas sem evidências são meros palpites e não contribuem para a produção de conhecimento científico. ●

Quadro 1. Postulados de Koch

Para que uma espécie patogênica possa ser acusada, de forma definitiva, como causadora de uma determinada enfermidade, o cientista alemão do século XIX estabeleceu requisitos conhecidos como os Postulados de Koch:

1. O organismo específico deve ser mostrado presente em todos os casos de animais que sofrem de uma doença específica.
2. O microorganismo específico deveria ser isolado do animal doente e cultivado em laboratório.
3. Estes organismos cultivados, quando inoculados em um animal de laboratório saudável, devem causar a mesma doença observada no animal original.
4. O organismo deve ser re-isolado em cultivo mono-específico a partir da infecção experimental.



Socialmente Justo e
Ambientalmente Correto

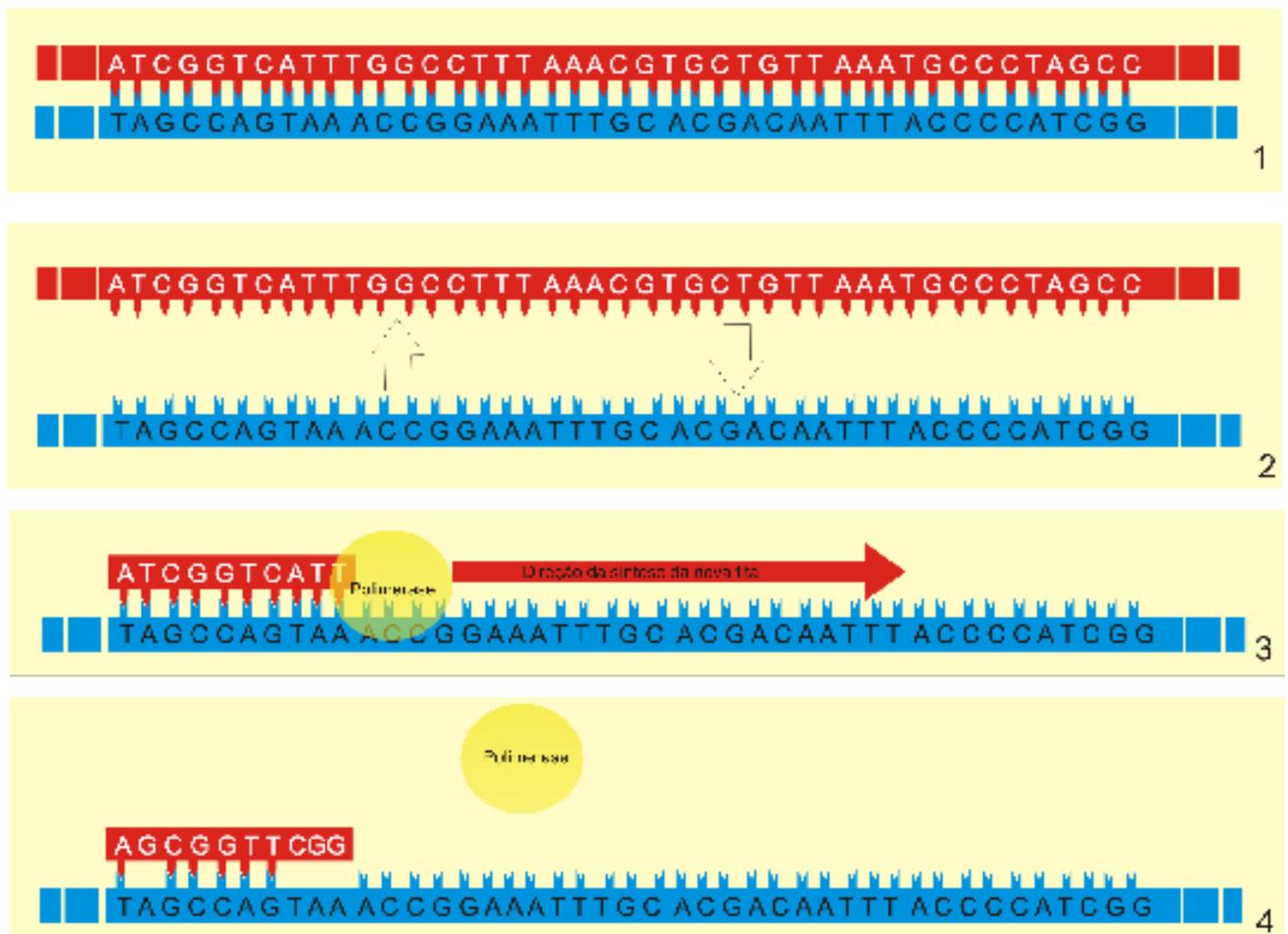


A TECNOLOGIA DO DNA A SERVIÇO DO MEIO AMBIENTE

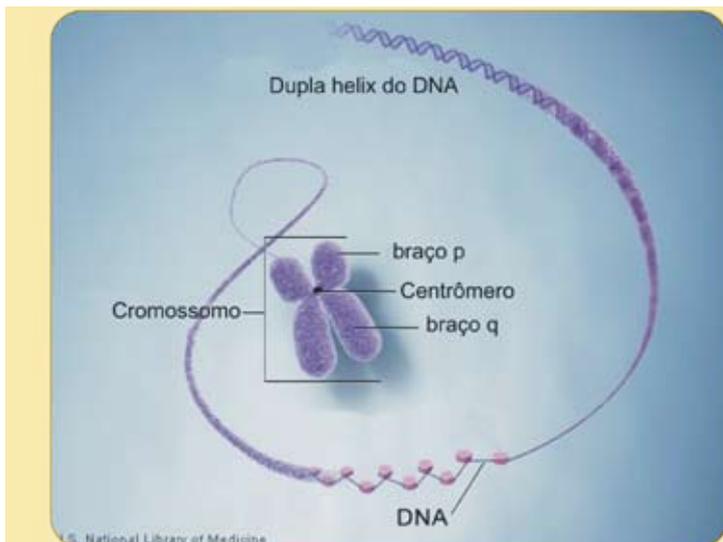
Marcio Pie, MSc
Biólogo GIA

O ácido desoxirribonucléico, mais conhecido por DNA, está presente em todos os organismos vivos. Da mesma forma em que letras são combinadas para formar palavras, frases, parágrafos e textos, as informações codificadas no DNA de uma espécie são usadas para transmitir as informações de “como construir um organismo

desta espécie” para gerações seguintes. Essas informações são codificadas usando 4 tipos diferentes de bases, comumente representadas pelas letras A, G, C e T (representando, respectivamente, adenina, guanina, citosina e timina). Essas letras são concatenadas em uma ordem determinada (ex. ...AGGATTATACACATTTC...), sendo então interpretadas de acordo com o desenvolvimento de cada organismo. A fita de DNA com estas bases concatenadas formam os cromossomos.



Funcionamento do princípio dos iniciadores específicos. O primeiro box mostra uma região hipotética do DNA do fungo. No segundo, as duas fitas complementares são abertas pelo aumento de temperatura (durante a reação de PCR). No terceiro, um iniciador específico se anela ao DNA do fungo. Note que há um encaixe entre as bases complementares (A com C e G com C), o que faz com que a polimerase se encaixe para o PCR, causando a amplificação e resultando em um teste positivo. No quarto, o iniciador se anelou ao DNA de um outro fungo hipotético mas a falta de encaixe perfeito impede que a polimerase se encaixe, tornando o teste negativo.



O DNA é organizado em cromossomos



Confirmando o resultado da amplificação do DNA em um gel de eletroforese

Há várias regiões em cada cromossomo. Algumas delas codificam proteínas como a hemoglobina, enquanto outras não possuem função conhecida. Embora várias dessas regiões sejam bastante conservadas entre espécies, outras apresentam muita variação, até mesmo entre dois indivíduos da mesma espécie. Essa variabilidade é o que possibilita, por exemplo, usar DNA para exames de paternidade.

Algumas regiões ao longo de um cromossomo são semelhantes entre indivíduos da mesma espécie, mas variam entre espécies. Essas regiões podem ser usadas como um “código de barras” genético, possibilitando uma identificação rápida e eficiente das mais diferentes espécies de organismos.

Em nossos estudos, seqüenciamos uma região do DNA do fungo associado à DCL chamada ITS (em inglês, Internal Transcribed Spacer). Essa região é particularmente apropriada para a identificação de espécies de fungos, e tem sido usada para esse fim há vários anos.

Uma vez seqüenciada, comparamos esta região com outras de fungos similares para identificar as seqüências de bases que só ocorrem no fungo da DCL. Essas regiões foram usadas para desenvolver um método de diagnose que pode ser usado para a diagnose da DCL. Foram desenvolvidos iniciadores (primers) que somente se anelariam à seqüência do fungo da DCL e

nenhum outro fungo (quadro).

Duas características são importantes para a eficiência de um iniciador específico:

- (1) Sensibilidade: ele deve ser capaz de detectar quantidades bastante pequenas do DNA do organismo alvo;
- (2) Especificidade: ele não deve responder positivamente para as espécies erradas de fungos (falsos-positivos).

Estudos no Laboratório de Ecologia Molecular do GIA indicam que os iniciadores desenvolvidos para o fungo da DCL apresentam ambas estas propriedades. Foram realizados testes com várias outras espécies de fungos, e em nenhum caso foi detectado um falso-positivo. Além disso, testes com quantidades cada vez menores do DNA do fungo da DCL indicaram que o método é capaz de detectar quantidades muito pequenas (alguns picogramas) de DNA alvo.

Este método molecular utilizando iniciadores específicos pode agora ser usado tanto na diagnose de caranguejos potencialmente doentes, como em amostras de fungo coletadas na natureza ou em outros organismos, como apresentado ao longo dessa revista. ●

O GRUPO INTEGRADO DE AQUICULTURA E ESTUDOS AMBIENTAIS

O Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais começou a ser formado em 1997, quando dois laboratórios pertencentes à Universidade Federal do Paraná resolveram juntar esforços com o objetivo de assumir um papel mais direto na interação da Universidade com o setor produtivo e a com a comunidade. A proposta era aplicar os métodos científicos na resolução de problemas nas áreas de produção de alimento e meio ambiente.

Inicialmente composto por professores dos Laboratórios de Aqüicultura (Dept. de Zootecnia) e de Parasitologia do Pescado (Dept de Zoologia), o GIA teve sua atuação voltada principalmente à aqüicultura, resolvendo problemas sanitários,

apoiando e orientando a implantação de projetos de produção, promovendo cursos de capacitação profissional e servindo de consultor de órgãos federais (MAA, CNPq) e internacionais (ONU) na diagnose e definição de estratégias para o desenvolvimento da atividade em todo o Brasil. A partir de 2000, a atuação do grupo ampliou-se, assim como o número de laboratórios associados. Colaboram com o GIA os laboratórios de Ecologia de Estuários, Laboratório de Biomassa, Laboratório de Micologia, dentre muitos outros da UFPR e de outras universidades nacionais.

Desde então, trabalhos foram desenvolvidos nas áreas de avaliação e previsão de impactos ambientais, repovoamen-

to de estoques de organismos aquáticos, monitoramento e recuperação ambiental. A partir de 2002, o GIA introduziu pesquisas de ponta na aplicação de marcadores moleculares na prospecção de organismos aquáticos invasores, na avaliação e monitoramento de processos de repovoamento de animais aquáticos, na orientação de ações de conservação e manejo de estoques de animais marinhos, na diagnose, identificação e determinação da dinâmica de enfermidades de espécies aquáticas de interesse econômico.

O GIA-UFPR detém hoje a melhor tecnologia mundial de reprodução controlada e larvicultura de caranguejos, que tem sido capaz de permitir a produção de até 2 milhões de larvas de caranguejos anualmente. A título de comparação, laboratórios dos Estados Unidos e Japão contatados informaram serem capazes de produzir um total anual nunca superior a 350 mil larvas. Adicionalmente, a equipe técnica do GIA-UFPR foi capaz de estender a larvicultura do caranguejo-uçá, resolvendo problemas técnicos que têm impedido o sucesso de inúmeros esforços de repovoamento de Decapoda Brachyura e outras espécies de crustáceos em todo



LEMPE: Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva. Sala do sequenciador de DNA.



o mundo.

Aliado aos estudos sobre a doença denominada de Doença do Caranguejo Letárgico (DCL), realizados pelo nosso pessoal, a capacidade técnica produzida de produção controlada de larvas do caranguejo-uçá representa uma ferramenta excepcional para acelerar a recuperação dos inúmeros estoques do caranguejo-uçá afetados pela doença ao longo do litoral brasileiro. Estes trabalhos têm sido destacados em inúmeras reportagens, notícias e documentários da imprensa escrita e televisionada a nível regional e nacional. Aliado a estes, estudos sobre a genética populacional do caranguejo-uçá nos estados de Sergipe e Paraná assumem um caráter fundamental no processo de conservação manejo desta espécie de imensa importância socioeconômica.

Por entender que o conhecimento científico deve resultar na melhoria da condição humana, o GIA-UFPR está atuando ainda em projetos de cunho de organização da cadeia produtiva da aquicultura e pesca (vide projeto CULTIMAR) com um enorme, pois atua junto a comunidades carentes do litoral brasileiro. Estes projetos, originalmente estruturados para aplicação no litoral paranaense estão sendo atraídos

para outros estados brasileiros, em especial Sergipe.

O GIA-UFPR é ainda reconhecido pela academia, pelo IBAMA, por órgãos ambientais estaduais, pelos Ministérios Públicos de diversos estados, por sindicatos e associações de classe de trabalhadores da pesca, por ONG's e pela indústria do petróleo internacional como referência na avaliação do impacto de atividades de prospecção sísmica sobre organismos marinhos. Isto é resultado de estudos desenvolvidos em diversas oportunidades no litoral baiano. Nestes estudos, foram realizados experimentos inéditos, que estão sendo atualmente utilizados pelo IBAMA



na definição dos critérios de licenciamento da atividade sísmica em ambientes costeiros.

Todos estes trabalhos resultam na produção de conhecimento técnico e científico que o GIA-UFPR tem disponibilizado das mais diversas maneiras: através da publicação de trabalhos científicos, palestras em congressos, livros publicados, folhas técnicas, reportagens e matérias em revistas especializadas, dentre outros. Um dos aspectos fundamentais de nossas pesquisas é a formação profissional de nossos alunos. Uma das críticas mais recentes da formação uni-

versitária brasileira é a dissociação daquilo que é ensinado em classe com os problemas enfrentados pela comunidade brasileira e pelo setor produtivo. Em todos os projetos desenvolvidos, uma porção significativa das equipes é composta por alunos de graduação, mestrado e doutorado de diversos cursos e programas de nossa universidade. Neste contexto, alunos em treinamento têm a oportunidade de atuar diretamente na resolução de problemas ambientais e de produção, aplicando, na prática, alguns dos ensinamentos obtidos em classe e desenvolvendo habilidades adicionais que o ajudarão em sua vida profissional futura. Alguns de nossos ex-alunos já atuam na iniciativa privada, com suas próprias empresas, outros egressos atuam no ensino superior, outros deram continuidade aos seus estudos na pós graduação.

Adicionalmente, recursos gerados pelo GIA-UFPR têm financiado bolsas de iniciação e de pós-graduação de diversos alunos de nossa universidade, complementando os recursos muitas vezes limitados das agências de fomento e de nossa própria instituição. Estes mesmo recursos, em associação com a infra-estrutura, material de consumo, e conhecimentos, resultantes de nossos projetos, foram e são fundamentais para o desenvolvimento de inúmeras monografias de graduação, dissertações de mestrado e teses de doutorado de cursos da UFPR. ●

ELE VIVE NA LAMA, MAS TEM SANGUE AZUL

Gisele Castilho, Msc

Pesquisadora do GIA

Popularmente conhecido no Brasil como caranguejo-uçá, catanhão, caranguejo do mangue ou caranguejo-verdadeiro, *Ucides cordatus* foi observado pela primeira vez no litoral brasileiro no início do século XIV por jesuítas e viajantes portugueses.

O caranguejo-uçá habita manguezais localizados na costa atlântica do continente americano, desde a Flórida (Estados Unidos) até Santa Catarina (Brasil).

Dentre os recursos naturais extraídos de manguezais, a captura de caranguejo-uçá é considerada a atividade econômica mais importante conduzida em escala comercial no Brasil. Este caranguejo tem grande importância para as populações litorâneas, pois é utilizado como alimento e sua comercialização contribui com a renda familiar. Além disso, o caranguejo-uçá tem importante papel na decomposição de matéria orgânica através da ingestão e eliminação de resíduos vegetais. A degradação de folhas dentro de tocas, realizada pelo caranguejo-uçá, é cerca de 2,4 vezes mais rápida que a ocorrida na superfície do solo. Aproximadamente 75% de matéria úmida proveniente das folhas caídas no mangue são rapidamente incorporadas ao sedimento devido à ação do

caranguejo-uçá, que utiliza as folhas que caem das árvores do mangue como alimento. Por esse motivo ele é considerado um dos seres vivos mais importantes do ecossistema de manguezais.

Encontrado exclusivamente em manguezais, o caranguejo-uçá habita regiões influenciadas pelas marés, em substratos macios, onde constrói tocas com uma profundidade máxima de 2 metros, promovendo a oxigenação das camadas mais profundas de sedimento.

Considerado o maior de sua família (Ocypodidae), esse caranguejo faz incursões terrestres durante a maré baixa para limpar ou construir a toca e

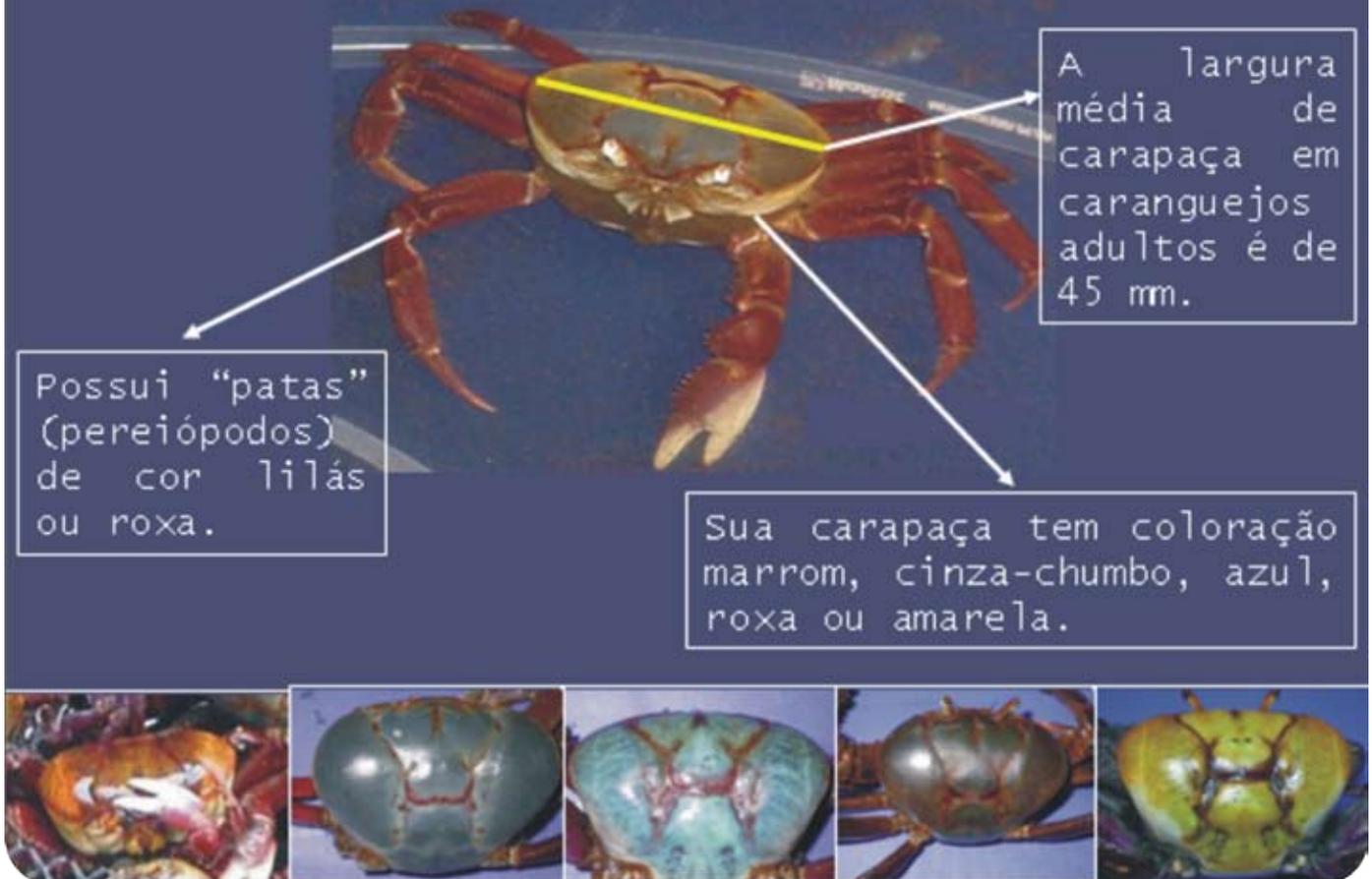
se alimentar. O alimento ingerido, em sua maioria, é de origem vegetal (raízes, cascas, galhos, algas, folhas em decomposição, frutos e sementes), podendo ser composto por sedimento (silte) misturado à matéria orgânica e, ocasionalmente, alimentos de origem animal, como crustáceos, poliquetas, insetos e moluscos bivalves ou gastrópodes.

O caranguejo-uçá apresenta comportamento territorialista, construindo galerias individuais que são intensamente protegidas de invasores por seus habitantes. Os caranguejos permanecem dentro das tocas quando submersas, obtendo proteção contra predadores e contra

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO CARANGUEJO-UÇÁ



COMO IDENTIFICAR O CARANGUEJO-UÇÁ:



a dessecação, além de ser naturalmente exposto à ampla variação de salinidade resultante das variações de maré.

Ao longo do ano são observadas diferentes colorações de carapaça nos caranguejos que, em fêmeas, estão relacionadas com a reprodução.

O comportamento reprodutivo da espécie se caracteriza pela presença de caranguejos machos produzindo uma espuma branca e exalando um odor característico por todo o mangue; a "andada" para acasalamento, quando indivíduos de ambos os sexos se deslocam desordenadamente para um lado e outro, perseguindo-se mutuamente; o acasalamento; e, a liberação das larvas. Estas larvas nadam, alimentam-se

de pequenas algas e animais microscópicos presentes na água e sofrem processos de muda, quando crescem e modificam sua aparência. Quando atingem a fase de megalopa, que precede a primeira fase de caranguejo propriamente dita, elas saem da água para construir sua toca no sedimento. O caranguejo-uçá é uma espécie longeva, com um período máximo de vida de mais de dez anos e que alcança a maturidade sexual em torno 2,1 a 3,0 anos para fêmeas.

Esta espécie também se destaca por sua importância na análise de impactos ambientais e na cultura popular. O caranguejo-uçá é um importante biomonitor de áreas críticas, pois, além de ser encontrado em grande parte do litoral brasileiro,

demonstra sensibilidade a diversos poluentes. Esta espécie também é amplamente consumida e tradicionalmente utilizada pela população como recurso medicinal para o tratamento de doenças. No que se refere ao valor nutricional da carne de *U. cordatus*, é um alimento rico em proteínas e minerais, principalmente zinco, com baixos teores lipídicos e calóricos.

Curiosamente, sua nobreza entre as espécies de caranguejos não só é verificada pela importância sócio-econômica, cultural e ambiental, mas também pela coloração azulada de sua hemolinfa, o sangue dos crustáceos, conferida pela presença de hemocianina.●

É UM FUNGO, SIM SENHOR!

Como já deve estar claro ao leitor, determinar a causa (agente etiológico) de uma doença não é uma tarefa trivial. Isso somente é possível depois que vários critérios sejam cumpridos, de acordo com o Postulado de Koch, descrito anteriormente. Nesta seção, abordamos cada um dos itens do Postulado de Koch e mostramos como nossos resultados indicam que a doença do caranguejo letárgico realmente é causada por um fungo.

1. O agente precisa ser detectado no hospedeiro infectado

Dados de várias fontes diferentes (microscopia óptica, microscopia eletrônica, isolamento em placas de Petri, sequenciamento de DNA) acusaram a presença de fungos nos tecidos de indivíduos do caranguejo-uçá com sintomas da DCL. Além disso, a abundância das diversas formas fúngicas (conídios, hifas, células leveduriformes) foi maior em indivíduos que apresentavam sintomas mais severos.

2. O microorganismo específico deve ser isolado do animal doente e cultivado em laboratório

Amostras de tecidos de indivíduos doentes foram utilizadas para o cultivo do fungo causador da DCL em laboratório, usando métodos microbiológicos específicos para este fim. Várias linhagens foram isoladas de diferentes hospedeiros, sempre apresentando as mesmas características em suas colônias (coloração, taxa de crescimento, tipo de meio de cultura onde cresce, forma das estruturas sob microscopia óptica). Essas características são fundamentais para que seja realmente isolado o fungo de interesse e não simplesmente algum contaminante eventual.

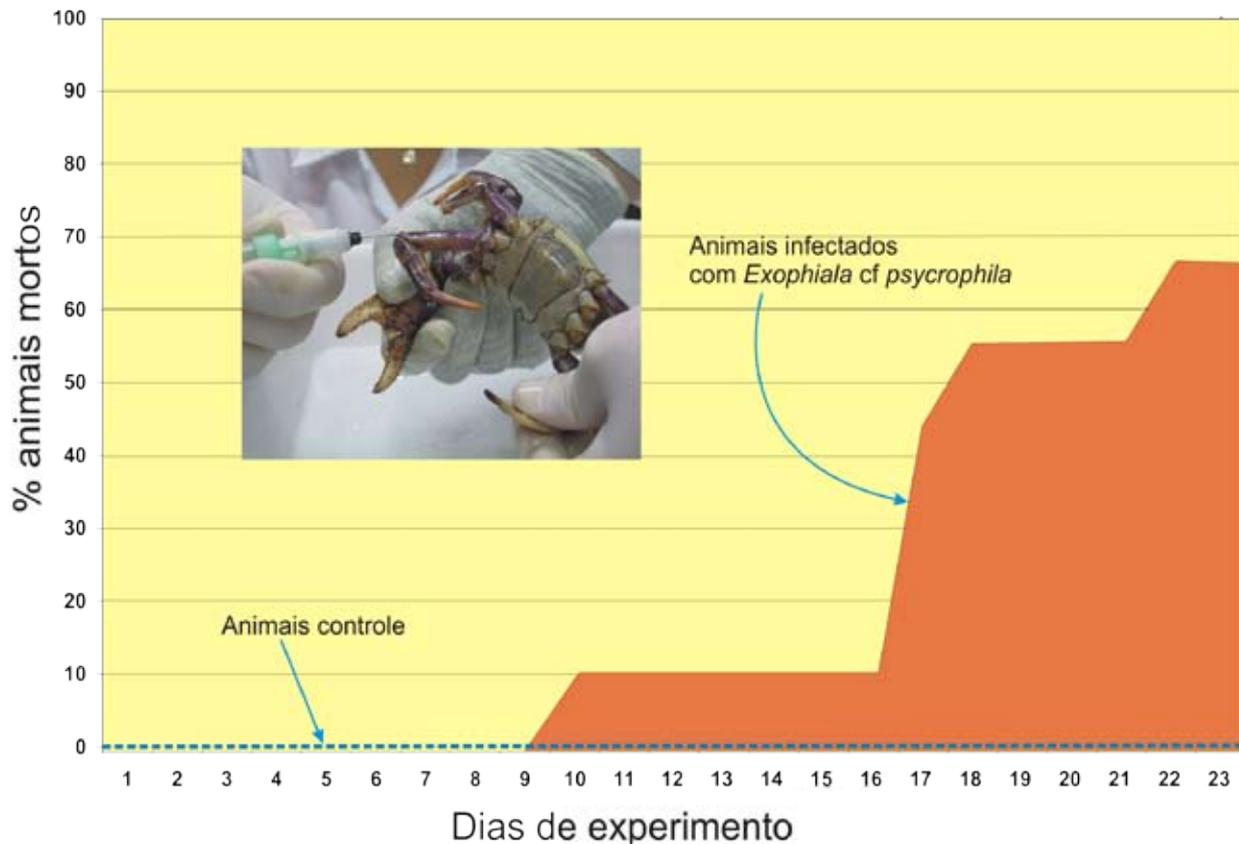
3. Estes organismos cultivados, quando inoculados em um animal de laboratório saudável, devem causar a mesma doença observada no animal original

Experimentos foram conduzidos em nosso laboratório, utilizando caranguejos coletados em estuários do estado do Paraná, uma região que, até o momento, está livre de mortandades causadas pela DCL (os registros mais ao sul da DCL são do estado do Espírito Santo). Contudo, estudos prévios em



Etapas do experimento de infecção artificial: A e B. isolamento do fungo; C e D. Preparo de solução de fungo em solução salina; E. injeção da solução de fungo no sistema sangüíneo dos caranguejos; F. acompanhamento em caixas aeradas com água do mar.

nossos laboratórios indicam que não há uma diferença nos perfis genéticos do caranguejo-uçá ao longo da costa brasileira entre Sergipe e Paraná, o que indica que os caranguejos paranaenses deveriam apresentar um grau de imunidade semelhante àqueles oriundos de regiões mais ao norte. Durante o experimento, a grande maioria dos caranguejos morreu em consequência da exposição ao fungo previamente isolado de caranguejos doentes e cultivado no laboratório. Além disso, antes de morrerem, os caranguejos apresentaram os mesmos sinais clínicos observados em caranguejos afetados pela DCL em manguezais nordestinos. Os indivíduos que sobreviveram ao final dos experimentos foram sacrificados. Nenhum animal dos grupos controle morreu durante este experimento. Todos animais



Resultado do experimento de infecção experimental. Animais injetados com células do fungo parasito morreram entre 9-23 dias do início dos experimentos enquanto os animais controle, injetados apenas com solução salina, permaneceram vivos ao longo de todo o experimento.

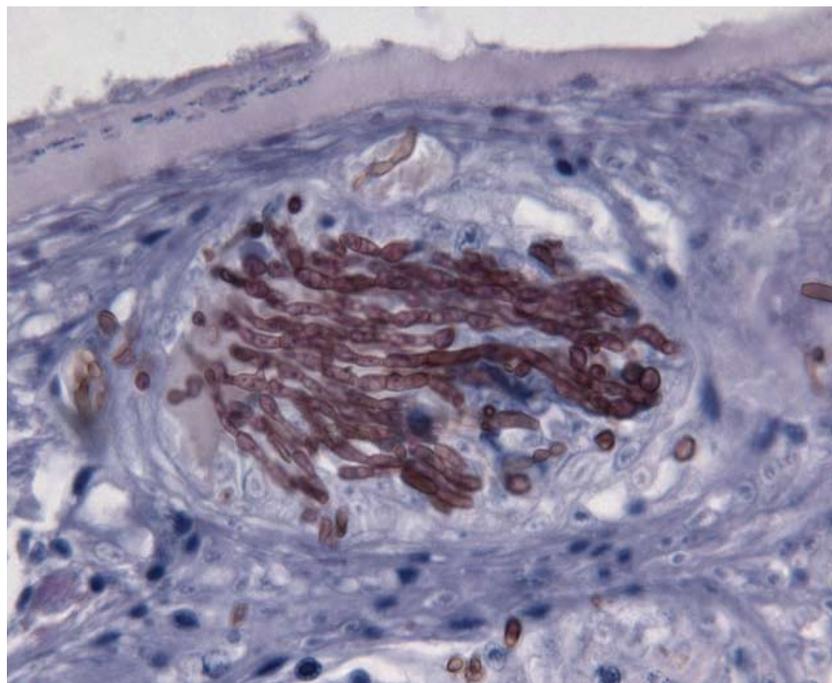
infectados artificialmente apresentavam células leveduriformes e hifas catenuladas no tecido cardíaco, em especial, causando patologias semelhantes àquelas observadas em animais naturalmente enfermos. A aplicação dos marcadores moleculares específicos para *Exophiala cf. psychrophila* da DCL produziu resultados positivos, confirmando a identidade das células leveduriformes e hifas observadas nos cortes histológicos do coração de caranguejos infectados artificialmente.

4. O organismo deve ser re-isolado em cultivo mono-específico a partir da infecção experimental

Durante todos os experimentos descritos acima, amostras de hemolinfa de animais artificialmente infectados e que morreram com sinais clínicos de DCL foram utilizadas para semear meios de cultura específicos para leveduras negras. Apesar do crescimento de leveduras negras ser reconhecidamente difícil, muitas das placas assim semeadas apresentaram colônias de fungos negros, dos quais a espécie de *Exophiala* coletada de animais enfermos na natureza faz parte. A aplicação dos marcadores moleculares específicos para a espécie de *Exophiala* associada com a DCL, em extratos obtidos destas culturas, produziu resultados positivos.

É importante ressaltar que o cumprimento dos itens do postulado de Koch de forma alguma sugere que foram elucidados todos os aspectos de uma doença.

Pelo contrário, vários elementos fundamentais da DCL ainda são pouco conhecidos, como a(s) via(s) de infecção, a dinâmica da doença dentro do hospedeiro (que órgãos são afetados e em qual ordem), a existência de caranguejos resistentes à DCL e os mecanismos desta possível resistência. ●



Hifas de fungo presentes no tecido de animais que morreram durante o experimento de infecção artificial.

A DCL E A FÁBULA DO VÍRUS

Como tem sido amplamente noticiado na imprensa, a Doença do Caranguejo Letárgico, também conhecida como DCL, vem promovendo extensas mortandades nas populações de caranguejo-uçána costa Nordeste do país, em especial entre os estados da Paraíba e Bahia. A DCL encontra-se em expansão, especialmente no sentido norte sul, tendo atingido, no verão de 2004-2005, as populações desta espécie de caranguejo no sul da Bahia e este ano (verão de 2005-2006) chegou ao Estado do Espírito Santo. A presença desta enfermidade nos manguezais de São Mateus (ES) foi confirmada recentemente pelo Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE), do GIA. Tal padrão de expansão, associado a outras características da doença, indica que esta seja uma enfermidade infecto-contagiosa.

Isto tem levado diferentes grupos a sugerir agentes infecciosos distintos para a DCL. A equipe do LEMPE tem apresentado evidências robustas de que um fungo dematiáceo, do grupo das leveduras negras, é de fato o agente causador da enfermidade. Estas conclusões são baseadas em análises histológicas, microscopia óptica e eletrônica, orfológicas, de

*Esta matéria foi veiculada na revista "Panorama da Aqüicultura", Janeiro/ Fevereiro 2006

seqüências de DNA, cultivo e experimentos realizados e outros que ainda estão em andamento. A primeira publicação sobre o assunto (Boeger et al., 2005) está disponível online, na revista

PESQUISAS DEMONSTRAM QUE A MORTANDADE DE CARANGUEJOS QUE ASSOLA O LITORAL BRASILEIRO NÃO É CAUSADA POR VÍRUS RELACIONA- DO AO VANNAMEI

científica Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (<http://www.scielo.br>).

No ano de 2004, entretanto, uma equipe da Universidade de São Paulo - USP apresentou a hipótese de que a DCL estaria

associada a enfermidades que assolam camarões de cultivo, especialmente vírus de *Litopenaeus vannamei*. Esta idéia foi primeiramente veiculada no II Simpósio Brasileiro de Oceanografia (ver box) e depois continuamente difundida, através de palestras, por todo o país. Apesar desta hipótese do grupo da USP ser baseada apenas e tão somente em evidências circunstanciais, a idéia não poderia ser descartada sem a realização de análises laboratoriais mais apuradas. Infecções por leveduras em crustáceos e outros organismos são comumente encontradas em conjunto com infecções de origem viral. Apesar da equipe do LEMPE não ter detectado NENHUMA evidência de infecção de origem viral em análises histopatológicas (microscopia óptica e eletrônica) e em experimentos preliminares,



O experimento de infecção artificial foi realizado em laboratório, com condições controladas de luz, aeração e temperatura

foram realizadas análises visando responder a duas perguntas:

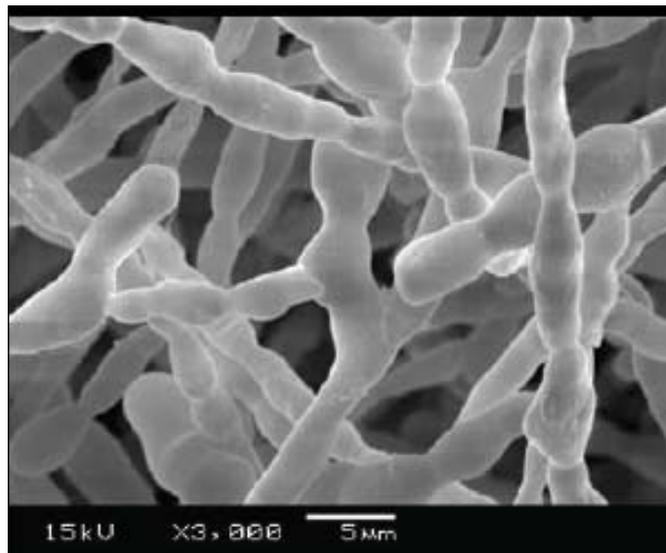
1) Existe alguma evidência de que a DCL seja causada primariamente por um vírus, sendo, neste caso, a levedura apenas uma infecção secundária?

2) Existe alguma espécie de vírus que afeta o *Litopenaeus vannamei* presente nos tecidos dos caranguejos enfermos?

Para responder a essas perguntas, amostras de caranguejos enfermos foram encaminhadas para análise de prospecção de vírus em geral, através de aplicação de filtrado de tecido de animal doente em um cultivo de células (em colaboração com a equipe do Laboratório Marcos Enrietti, da

Secretaria de Agricultura do Estado do Paraná), e de vírus patogênicos conhecidos para *L. vannamei*, através do uso de diagnóstico molecular (análises realizadas pela equipe do Dr. Donald Lightner, da Universidade do Arizona, nos Estados Unidos).

Complementarmente, um experimento de infecção experimental em laboratório foi realizado através da injeção de filtrado de tecido de caranguejo-uçá enfermo pela DCL em animais saudáveis, capturados em região distante da área de ocorrência da doença. Vírus são organismos muito pequenos, muito menores do



Micrografia em microscópio de varredura de uma colônia de fungo negro isolada da hemotifina de animais enfermos pela DCL

que os outros tipos de agentes patogênicos. Assim, filtrando o tecido homogeneizado de animais enfermos em filtros de

A seguir a tradução do resumo do trabalho realizado pela equipe de pesquisadores tendo a frente a Dra Yara Schaeffer-Novelli, professora da USP. O trabalho foi apresentado no II Simpósio Brasileiro de Oceanografia, realizado em São Paulo, no ano de 2004.

A mortandade de caranguejo-do-mangue no Nordeste do Brasil: Evidências circunstanciais para uma epizootia com origem relacionada à produção de camarão peneídeo marinho

Por: Schaeffer-Novelli, Y.1 Cintrón-Molero, G.2
Coelho-Jr, C.3
Almeida, R.4
Menghini, R.P.5

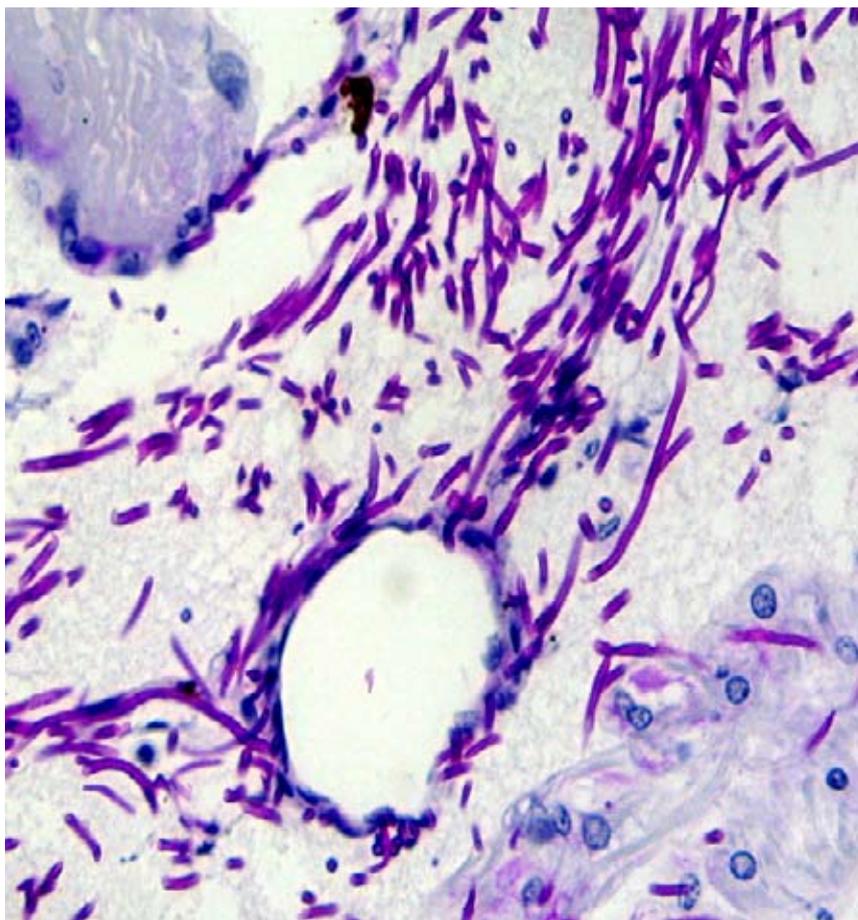
1BIOMA Associate Professor, University of São Paulo, Brazil; novelli@usp.br, 2US Fish and Wildlife Service, Department of the Interior, USA; BIOMA Associate; 3BIOMA Graduate Student (FAPESP PhD fellowship); 4.BIOMA Graduate Student (CAPES MSc fellowship). 5.

Nas últimas décadas vêm ocorrendo um aumento nos relatos sobre doenças que afetam ecologicamente e economicamente importantes organismos marinhos, que resultaram em dramáticas alterações nas estruturas dos estoques das comunidades selvagens. A extrema simplificação de sistemas naturais também provoca a deflagração de mortalidades por doenças. A aquíicultura em geral, e a carcinicultura marinha em particular, são exemplos clássicos onde a simplificação extrema de um sistema natural complexo na direção do monocultivo, levou a grandes problemas de doenças infecciosas. No Brasil, a rápida propagação de uma mortalidade em massa de origem desconhecida que iniciou em 1997, afetando populações selvagens do caranguejo do mangue (*Ucides cordatus* L. 1763). Mortandades em massa foram registradas desde o sul do Estado da Bahia até o Piauí e esses eventos são acompanhados de drásticas mortalidades e o colapso das populações em

alguns locais. Em geral, a quantidade limitada de informações disponíveis, desafia bastante a nossa habilidade de distinguir se estes eventos são manifestações de uma nova enfermidade, um aumento da virulência de uma doença predominante, se representa uma alteração de hospedeiro de um patógeno já conhecido (como resultado do aumento dos transportes de animais em todo o mundo e inclusive de seus patógenos), ou se não estão associados a causas biológicas, como a degradação de habitats ou o estresse induzido por agentes poluentes.

Existem algumas similaridades entre o caranguejo do mangue e os camarões peneídeos em termos de relacionamentos filogenéticos, habitats, fisiologia e históricos de padrões de vida. Embora os catadores de caranguejos do mangue saibam que as populações de caranguejo variam ciclicamente, os colapsos catastróficos e a diminuição local das populações, não eram relatadas antes de 1997. Realizamos uma comparação simples entre os principais sintomas registrados por várias fontes para as dez principais doenças em camarões cultivados, incluindo HPV, IHNV, MBV, BPVS, WSSV, TSV, NHP, NIM, Black Death e Vibriosis, e os sinais macroscópicos proeminentes apresentados pelos caranguejos infestados mortos e moribundos, ao longo da costa do Nordeste do Brasil (incluindo os danos no sistema digestório, hepatopâncreas, outros órgãos internos, anorexia, comportamento letárgico, e alteração de cor da carapaça). Consideramos que as coincidências entre estas doenças dos camarões e os principais sinais visuais manifestados pelo caranguejo do mangue, insinuam que um agente biológico infeccioso é o agente causador da deflagração de mortalidades massivas, e que não são ocorrências isoladas ou respostas locais ao uso de substâncias agroquímicas ou de sobreexploração desses recursos naturais.

As autoridades competentes devem explorar a possibilidade de um caminho da doença partindo do camarão de fazenda para o caranguejo. O monitoramento acessível das populações selvagens de caranguejo do mangue e de camarões cultivados deve ser iniciado com uma base de rotina para a identificação de potenciais reservatórios naturais e de caminhos das doenças.



Microfotografia de corte histológico do tecido cardíaco de um caranguejo enfermo pela DCL. O fungo pode estar presente como células leveduriformes ou hifas, como nessa fotografia.

abertura muito reduzida (ex. 22 micrômetros) remove-se todas as partículas grandes, deixando apenas partículas muito pequenas, dentre elas as partículas de vírus. Se existissem vírus patogênicos neste homogeneizado, a injeção deste filtrado em caranguejos saudáveis deveria resultar na sua morte, antecedida pelos sintomas clássicos da DCL. Este experimento foi realizado utilizando-

se 10 animais, nos quais foi injetado este filtrado e 10 animais controle, nos quais apenas solução salina foi injetada.

Os resultados de todas estas análises e do experimento rejeitam a hipótese de que exista algum

vírus, conhecido ou desconhecido, promovendo o aparecimento da DCL. Não houve resultado positivo para vírus nem nos testes de infecção de células vivas em cultura (vírus em geral), nem nas diagnoses moleculares (vírus conhecidos de *L. vannamei*). O experimento com caranguejos vivos também não foi capaz de demonstrar

que animais nos quais foi injetado o filtrado de animais doentes tenham morrido em uma taxa maior do que

aquela observada nos animais controle. Assim, vai por água abaixo a teoria que associa enfermidades virais, não só de *L. vannamei*, como

também de qualquer outra origem, com a DCL. Por outro lado, experimentos ainda em andamento continuam a dar suporte às evidências de que a DCL seja uma doença causada por fungos.

A origem deste fungo no meio ambiente está sendo analisada através de uma grande prospecção de espécies animais, vegetais e amostras de solos, que vem sendo realizada nos estuários do Estado de Sergipe. As análises incluem também camarões *L. vannamei* coletados diretamente de viveiros de cultivo de fazendas sergipanas. Este trabalho, financiado pelo Governo de Sergipe, e as coletas, foram realizadas em parceria com o Centro de Pesquisa e Gestão de Recursos Pesqueiros do Litoral Nordeste – CEPENE (IBAMA).

Quem desejar mais informações é só acessar a página do GIA na internet. (<http://gia.bio.ufpr.br>) ●

A DCL NA MÍDIA

Esse projeto, que objetivou desvendar aspectos sobre a mor-tandade do caranguejo-uçá (*Ucides cordatus*), ganhou grande espaço na mídia desde o seu início. A imprensa televisionada, escrita e eletrônica tem dado especial atenção aos resultados que vêm sendo divulgados em âmbito nacional. Destaques devem ser dados às reportagens veiculadas na revista Veja e no Jornal Nacional, que atingiu um enorme número de lares em todo o país. A seguir apresentamos uma tabela com algumas dessas veiculações.



Meio de Comunicação	Emissora	Data	Duração	Alcance da Transmissão
Internet	Site Bom Dia Sergipe	17/05/2004	02:24	Todo Estado
Internet	Site Estação Agrícola SE	23/05/2004	03:26	Todo Estado
TV	Globo Repórter	04/06/2004	03:40	Nacional
TV	SE TV 2	03/09/2004	01:54	Todo Estado
Revista	Panorama de Aqüicultura	Set / Out 2004	1 página	Nacional
Jornal	Local	15/10/2004	½ página	Salvador
Internet	Site Jornal A Tarde (BA)	21/12/2004	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Jornal A Tarde (BA)	21/12/2004	Nota	Nacional / Internacional
Revista	Pesquisa FAPESP	Jan 2005	nota	Todo Estado
Revista	Veja	12/01/2005	2 páginas	Nacional / Internacional
Revista	Ciência Hoje	Jan / Fev 2005	½ Página	Nacional
Internet	Site VTN Notícias	02/02/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Cinformonline	12/02/2005	½ página	Nacional / Internacional
Internet	Correio da Bahia	20/03/2005	4 páginas	Nacional / Internacional
Internet	Site agencia.se.gov.br	14/04/2005	6 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Correio de Sergipe.com	06/05/2005	½ página	Nacional / Internacional
Internet	Site ilheusamado.com	13/05/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Jornal A Tarde (BA)	16/05/2005	1 página	Nacional / Internacional
Jornal	Jornal de Pernambuco	22/05/2005	1 página	Todo Estado
Internet	Site IlhéusAmado.com	24/05/2005	7 páginas	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	03/06/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site UFPR	20/07/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	12/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	13/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Jornal	Jornal A Gazeta	13/09/2005	Nota	Todo Estado
Internet	Site seculodiario.com	14/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	15/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	16/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site notícia do Jornal A Tarde de Salvador	17/09/2005	3 páginas	Nacional / Internacional
Internet	Site ECO Brazil (japonês)	17/09/2005	1 página	Internacional
Internet	Site seculodiario.com	22/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Guaraparionline.com	26/09/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	03/10/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com	28/10/2005	1 página	Nacional / Internacional
Revista	Ciência Hoje	Nov 2005	4 páginas	Nacional
Internet	Site Ciência Hoje	Nov 2005	Nota	Nacional / internacional
Internet	Site Infonet notícias	29/11/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Departamento de Rádio (SE)	01/12/2005	Nota	Nacional / Internacional
Internet	Site seculodiario.com (SE)	07/12/2005	1 página	Nacional / Internacional
Internet	Site Prefeitura de Vitória	27/01/2006	1 página	Nacional / Internacional
Revista	Panorama de Aqüicultura	Jan / Fev 2006	3 páginas	Nacional

POR DENTRO E POR FORA DOS FUNGOS NEGROS DA DCL

Walter Boeger, PhD
Vania Vicente, Dra
Pesquisadores do GIA

Assim como as plantas e os animais, os fungos compõem um reino próprio e independente. São mais de 80.000 espécies, que ocorrem em ambientes os mais diversos na Terra, com os mais variados hábitos. Existem espécies marinhas, de água doce, terrestres, comensais e parasitas. A maioria se alimenta de matéria orgânica em decomposição, disponível no meio, enquanto outras são capazes de capturar e digerir presas, como qualquer outra espécie de organismo predador. Muitos são comestíveis e outros de importância fundamental no desenvolvimento de drogas utilizadas na medicina humana e animal.

A taxonomia dos fungos (FUNGI) é confusa principalmente devido à alta variabilidade morfológica e à alternância de fases de vida. Em algumas espécies podem existir mais de 5 diferentes morfotipos! A classificação do grupo incorpora agrupamentos não naturais e nomes específicos

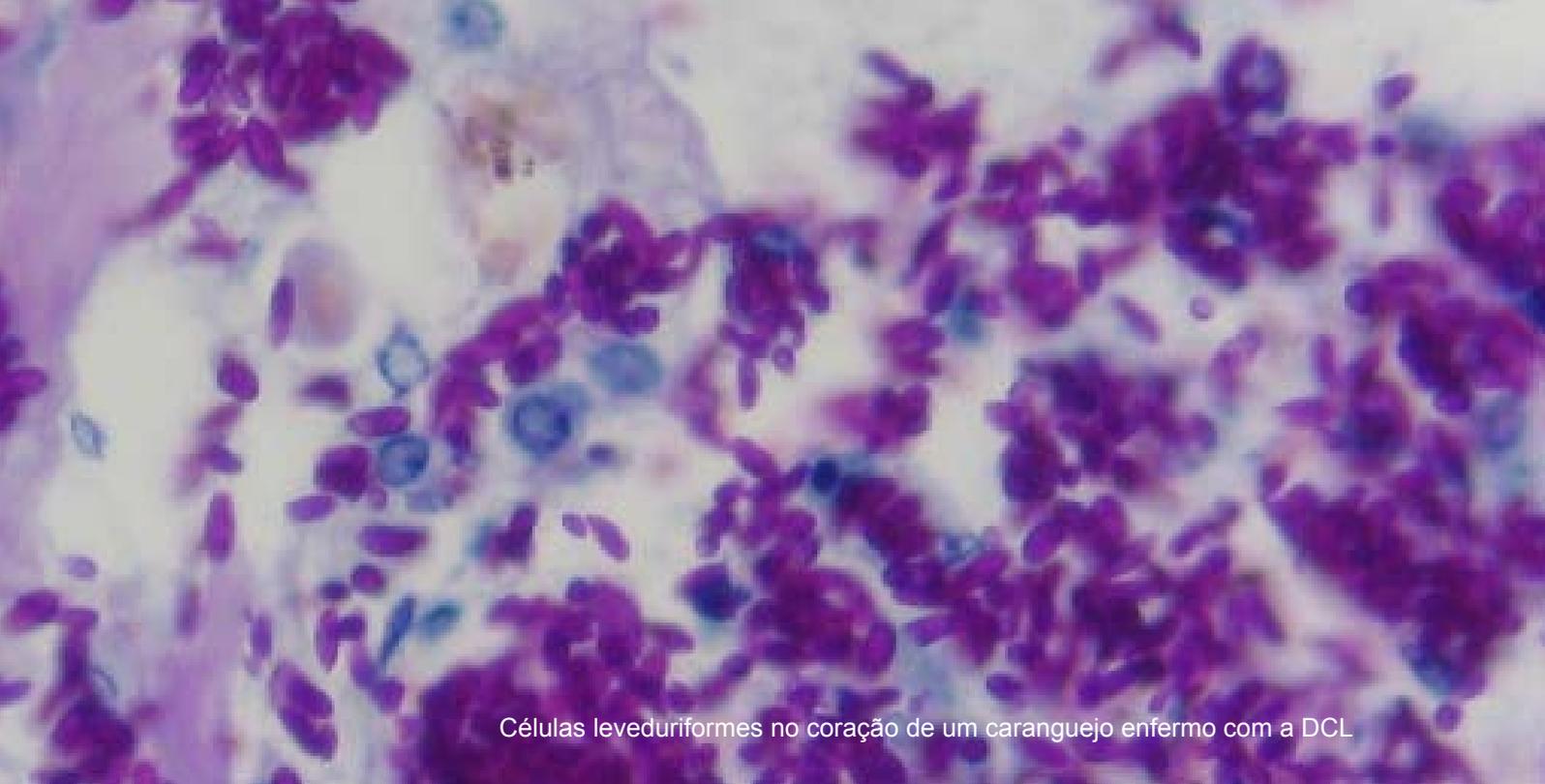
diferentes aplicados a uma única espécie. O uso de morfologia é hoje complementada pela análise de seqüências de DNA, sem as quais seria muito difícil identificar e caracterizar suas espécies.

Apesar da classificação confusa, os estudos morfológicos e moleculares suportam a identificação do agente patogênico como um membro do Filo Ascomycota, conhecidos como fungos dematiáceos ou fungos negros da família Herpotrichiellaceae.

Os ascomicetos representam o filo mais abundante e conhecido dentre os fungos (cerca de 50% das espécies conhecidas e cerca de 80% das espécies são patogênicas). Os fungos dematiáceos constituem um grupo grande e heterogêneo, caracterizado por reunir indivíduos que possuem pigmento escuro de melanina na parede celular das células vegetativas e reprodutivas. Estes fungos são comuns na natureza integrando-se principalmente ao solo e ao material orgânico em decomposição. Essas espécies ocorrem principalmente em regiões de clima tropical e subtropical.

Muitos delas são de vida livre, alimentando-se de matéria em decomposição. Porém uma parcela é responsável por inúmeros casos de micoses, especialmente aquelas espécies incluídas na família Herpotrichiellaceae. Muitos dos fungos dessa família exibem uma forte tendência à patogenicidade em hospedeiros invertebrados e vertebrados. Dentre as principais micoses causadas por este grupo destacam-se a cromoblastomicose e a feohifomicose.

A cromoblastomicose é caracterizada por uma infecção subcutânea. Estes fungos provocam uma reação tissular inflamatória purulenta e granulomatosa, apresentando-se no tecido do hospedeiro em forma de estruturas globosas de parede espessa e acastanhadas, denominadas de corpos muriformes, os quais se multiplicam. As espécies de fungos dematiáceos classicamente envolvidos na etiologia da cromoblastomicose são: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladophialophora carrioni*, *Phialophora verrucosa*, e *Rhinocladiella aquaspersa*.



Células leveduriformes no coração de um caranguejo enfermo com a DCL

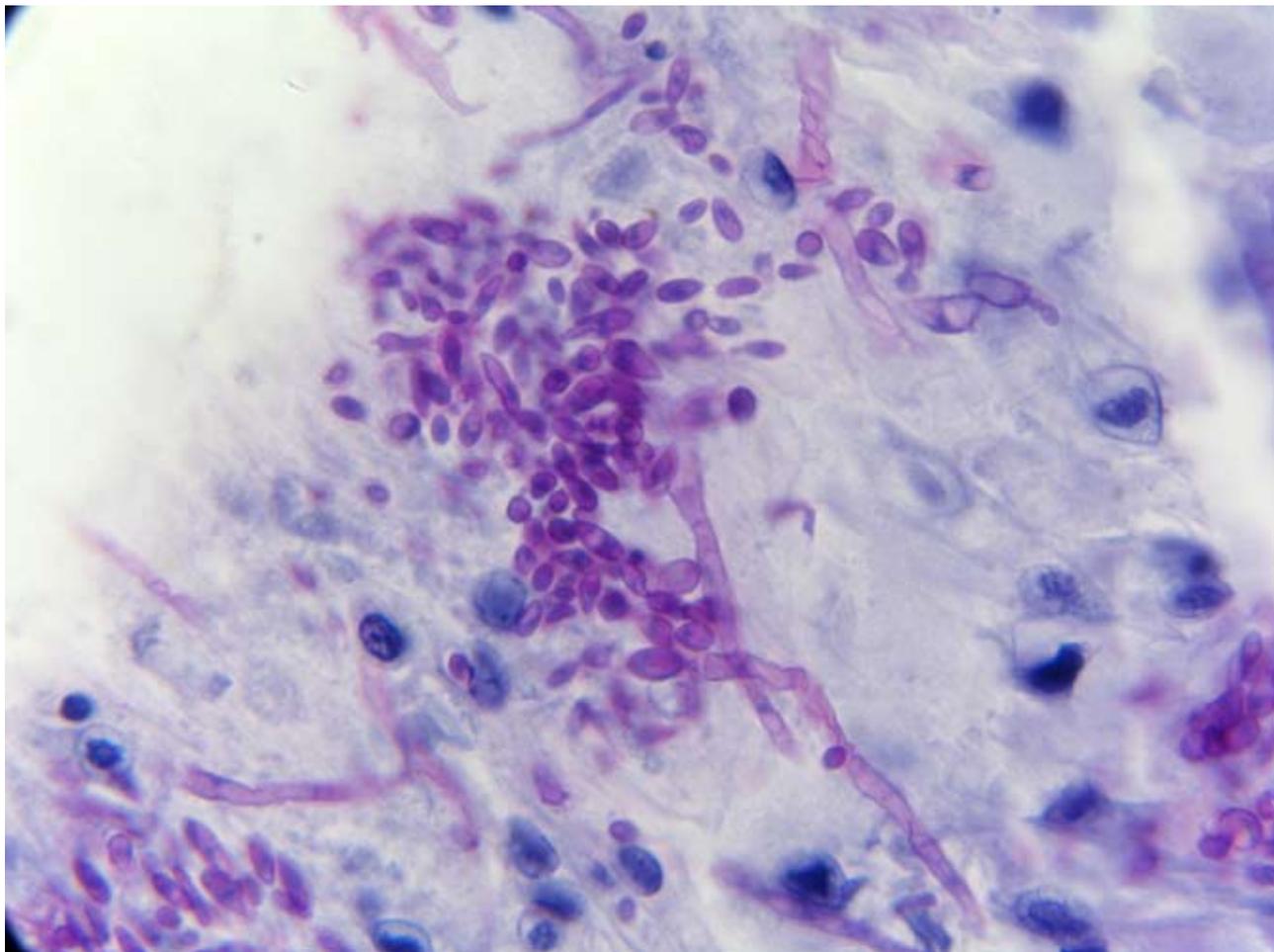
O termo feohifomicose abrange um amplo espectro de infecções oportunistas também causadas por fungos dematiáceos, incluindo desde a colonização superficial até a infecção sistêmica, podendo, em alguns casos, causar lesão cerebral em humanos e outros organismos. No caso da feohifomicose, o fungo dematiáceo apresenta-se nos tecidos lesados como células leveduriformes, pseudohifas, hifas verdadeiras ou qualquer combinação dessas formas. Os principais agentes etiológicos são os do gênero *Exophiala*, destacando-se *E. jeanselmei*, *E. dermatitidis*, *E. salmonis* e *E. psychrophila*.

Poucos grupos de fungos podem causar uma diversidade de quadros clínicos divergentes, como os da família *Heporthrichiellaceae*, que causam micoses em humanos sem serem dependentemente parasitas animais. Dentro deste grupo observam-se micoses que se estabelecem independentemente do estado imunológico do hospedeiro até micoses sistêmicas provenientes de inalação. O fato de esses agentes causarem infecções oportunistas

indica que essas espécies possuem fatores de crescimento nos seus nichos naturais, os quais devem favorecer a sobrevivência dentro de hospedeiros vertebrados e invertebrados.

Dois espécies de ascomycetos *hyporthrichielláceos*, conhecidas como fungos dematiáceos ou leveduras negras, foram detectadas nos tecidos dos caranguejos com DCL, *Exophiala* cf *psychrophila*





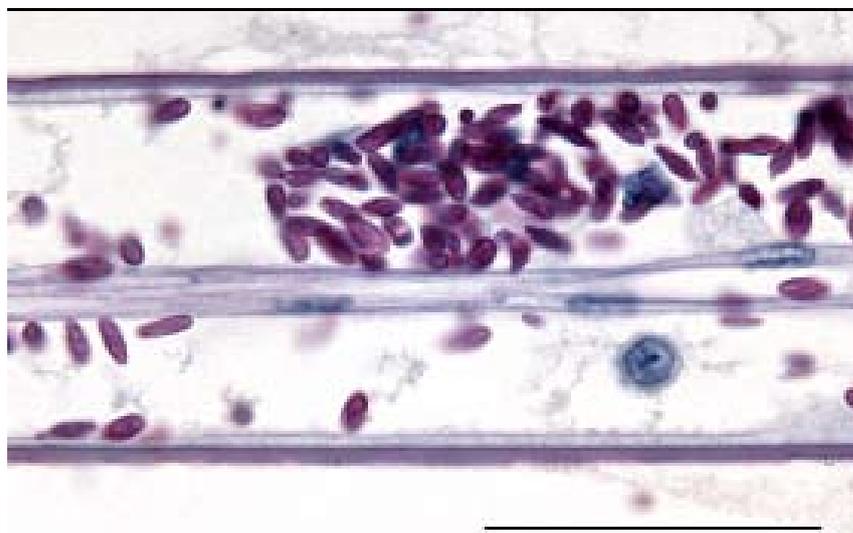
Hifas de Exophiala cf psycrophila produzindo conídios ou conidesporos

e *Cladophilophora cf devriesii*. Estudos realizados durante a execução do projeto indicam fortemente que o agente patogênico primário da DCL é *E. cf. psycrophila*. *Cladophilophora cf. devriesii* é encontrada sobre folhas em decomposição nos estuários analisados e é, portanto, considerada uma espécie oportunista, que se torna invasiva quando o hospedeiro, no caso o caranguejo, torna-se enfraquecido por *E. cf. psycrophila*, agente patogênico da DCL.

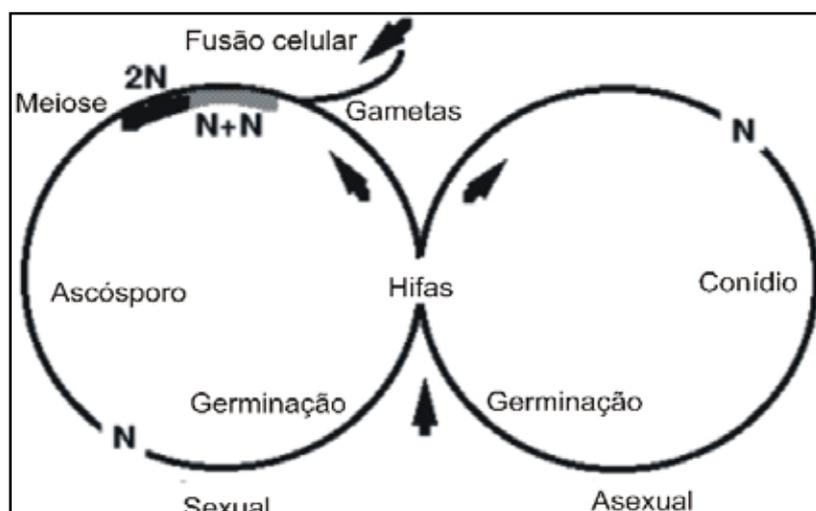
Três tipos morfológicos de seis fungos são encontrados na musculatura de caranguejos doentes: leveduras, hifas e conídios. Leveduras são formas unicelulares capazes de dividir-se por brotamento. Hifas e conídios

representam a fase denominada de anamorfo. Ascomicetos apresentam, assim como espécies de outros grupos de fungos, fases do ciclo de vida que se reproduzem

sexualmente e assexualmente. Hifas modificadas produzem conídios (também conhecidos como esporos ou conioesporos) que são liberados no tecido animal e eventualmente



Células leveduriformes (em coloração vinho) nas lacunas das brânquias de um caranguejo enfermo



Ciclo de vida generalizado de um ascomiceto incluindo a fase anamorfa (asexual) e teleomorfa (sexuada)

na circulação do animal. Os estágios do ciclo de vida sexuais, que são desconhecidos para a espécie patogênica da DCL, são denominados de teleomorfos; os estágios do ciclo de vida assexuado são os anamorfos. O conjunto dos dois ciclos é denominado de holomorfo (o fungo completo). Frequentemente, anamorfos e teleomorfos são descritos como entidades taxonomicamente distintas, em duas espécies e, muitas vezes, em dois gêneros diferentes!

Assim, apenas as formas anamorficas de *Exophiala cf psychrophila* são encontradas

parasitando o caranguejo-uçá. Espécies de *Exophiala* são fungos de dematiáceos distribuídos no solo terra, plantas, água, e em madeira em decomposição. Estas espécies, apesar de serem saprófitas na natureza, são reconhecidamente agente causadores de várias infecções humanas e em animais, inclusive invasões do sistema nervoso. Dentre as espécies de *Exophiala*, está incluída *E. salmonis*, um fungo negro conhecido por causar enfermidades em muitas espécies de água doce e salgada. Clinicamente, peixes infectados por *E. salmonis* ficam mais

escuros e letárgicos com nódulos dermais presentes e numerosos granulomas presentes em órgãos viscerais (fígado, rim, baço).

Exophiala cf psychrophila foi isolado com sucesso em meio de agar em placas de petri, mantidas em estufas microbiológicas. As colônias resultantes (vide Figura) são inicialmente formadas por células leveduriformes, úmidas e marrons ou preto esverdeado em coloração. A textura das colônias são inicialmente gelatinosas, tornando-se aveludadas, devido ao desenvolvimento de pequenas hifas aéreas acinzentadas. A cor dessas colônias é negro-esverdeadas e negras no reverso, quando maduras.

As colônias de *E. cf. psychrophila* estão sendo mantidas nos laboratórios do GIA, em Curitiba, e do Centraalbureau voor Schimmelcultures, em Utrecht, Holanda. Estas culturas estão sendo utilizadas para a confecção de trabalhos científicos, para experimentos e como espécimens-testemunho para o estudos que desenvolvemos e pretendemos continuar a desenvolver. ●



Cultivo de *Exophiala cf. psychrophila* isolado de caranguejos enfermos em agar de batata.

COMO O FUNGO PROVOCA A DOENÇA?

Marcio Pie, MSc
Diogo Hungria

Entender o funcionamento de uma doença é como montar um quebra-cabeças. No caso da DCL, embora algumas partes deste quebra-cabeça estejam sendo resolvidas, outras permanecem desconhecidas. Por exemplo, pouco sabemos sobre como se dá a transmissão e a infecção de novos hospedeiros no meio. Por outro lado, estudos de microscopia óptica desenvolvidos pelo GIA estão revelando cada vez mais detalhes sobre como a infecção se espalha pelo corpo do caranguejo-uçá e como o fungo interage com o seu sistema imune.

O sistema imune dos caranguejos é relativamente simples, sendo desprovido de anticorpos como ocorre nos vertebrados. Contudo, isso não significa que o seu sistema imune seja frágil. Há duas formas principais de defesa imune em caranguejos (e invertebrados em geral). A defesa humoral é baseada em substâncias que estão presentes no “sangue” (hemolinfa) desses organismos e inclui proteínas e enzimas; enquanto que a defesa celular é baseada em células sanguíneas (hemócitos) que estão dispersas no sistema circulatório. Este último tipo de defesa é uma das principais formas que invertebrados têm para eliminar

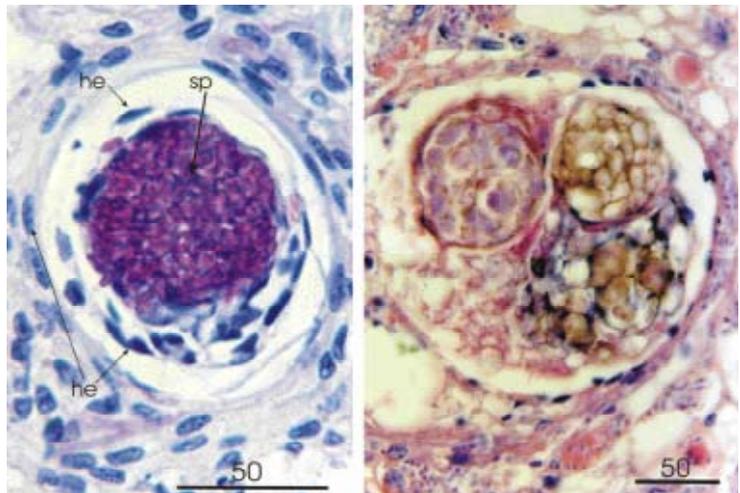


Figura 1. Nódulos dormados por hematócitos (he) que se organiza de tal forma a envolver e isolar corpos estranhos no corpo do caranguejo, nesse caso as células leveduriformes do fungo da DCL (sp). O nódulo à direita é mais antigo do que o da esquerda, por isso observasse deposição de melanina e as células leveduriformes encontram-se em estado avançado de decomposição. As escalas estão em micrômetros.

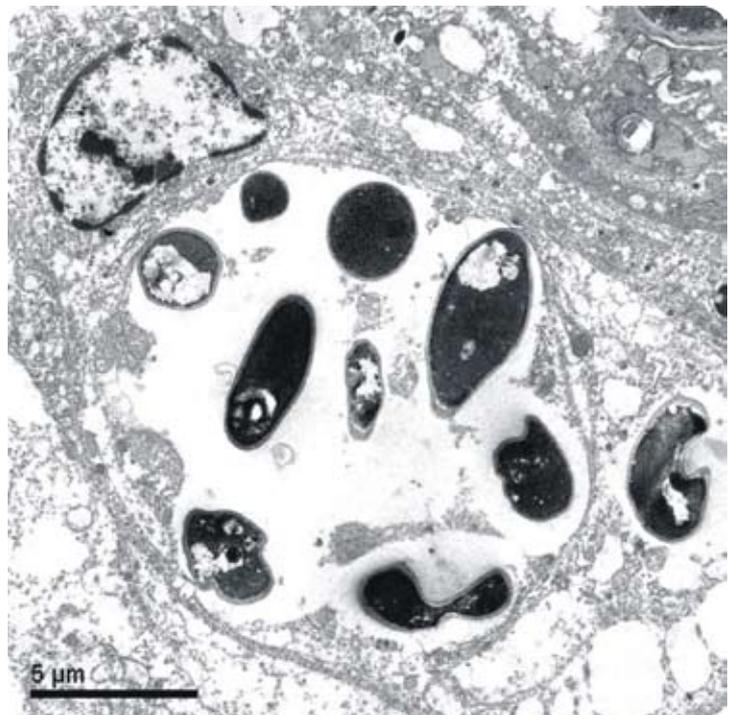


Figura 2. Microfotografia de microscopia eletrônica de uma célula fagocitária com esporos no interior de um grande vacúolo digestivo do coração de caranguejos enfermos

elementos estranhos como patógenos, tanto pela sua ingestão (fagocitose) ou pela aglomeração de células em torno do elemento estranho (encapsulação).

Coletas de caranguejos foram realizadas nas regiões onde a DCL foi detectada e todos os estudos realizados foram baseados na análise comparativa entre caranguejos com sinais clínicos da DCL e animais saudáveis.

Em alguns caranguejos saudáveis foram observados nódulos em torno de células leveduriformes ou hifas (Figura 1). Isso sugere que estes indivíduos tenham possivelmente sido expostos ao fungo da DCL, mas tenham conseguido neutralizá-lo antes que a doença se manifestasse. Adicionalmente, células fagocitárias fixas são encontradas em abundância nas paredes dos vasos sanguíneos, principalmente na região extracelular do hepatopâncreas e células fagocitárias livres são comuns no tecido cardíaco (Figura 2).

Por outro lado, em organismos doentes, ocorre uma extensa proliferação do fungo da DCL em diversos tecidos. A presença de nódulos contendo células leveduriformes no seu interior, indica que houve uma tentativa de combater o fungo no princípio da infecção. Aparentemente, há uma maior afinidade do fungo pelos tecidos do coração, do gânglio nervoso, das brânquias e do hepatopâncreas. Este padrão

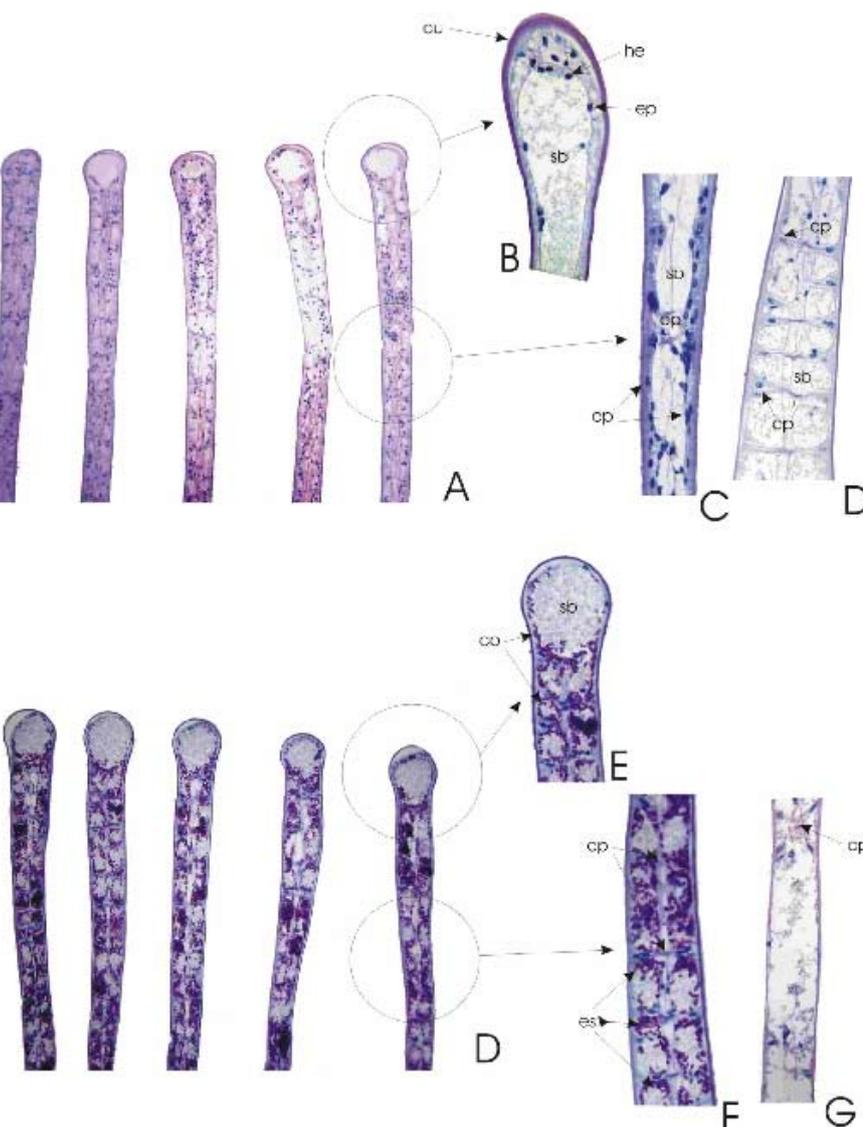


Figura 3. Cortes histológicas de brânquias do caranguejo-uçá saudáveis (acima) e enfermos com a DCL. Co e es = células leveduriformes (coradas em vinho); cp = células pilar (suporte); sb = seio hemal; cu = cutícula; ep = epiderme. Fig. 2G. Uma lamela branquial com aneurisma. Maiores detalhes no texto.

pode explicar os principais sintomas da doença, onde há dificuldade na locomoção, na movimentação das quelas e a perda de equilíbrio.

Em corte histológico, as lamelas branquiais de organismos saudáveis apresentam uma grande quantidade de hemócitos (Figura 3A), células pilares (cp), um epitélio branquial (ep) bem definido e uma cutícula fina (cu) revestindo todo o órgão.

As brânquias de organismos enfermos (Figura 7D-G), especialmente daqueles em estado avançado da enfermidade, apresentam uma grande quantidade de células leveduriformes (Figura 3B). Estas células promovem danos mecânicos na estrutura branquial que, certamente, prejudica o seu funcionamento. Nas brânquias comprometidas, partes dos seios hemais branquiais (Sb na Figura

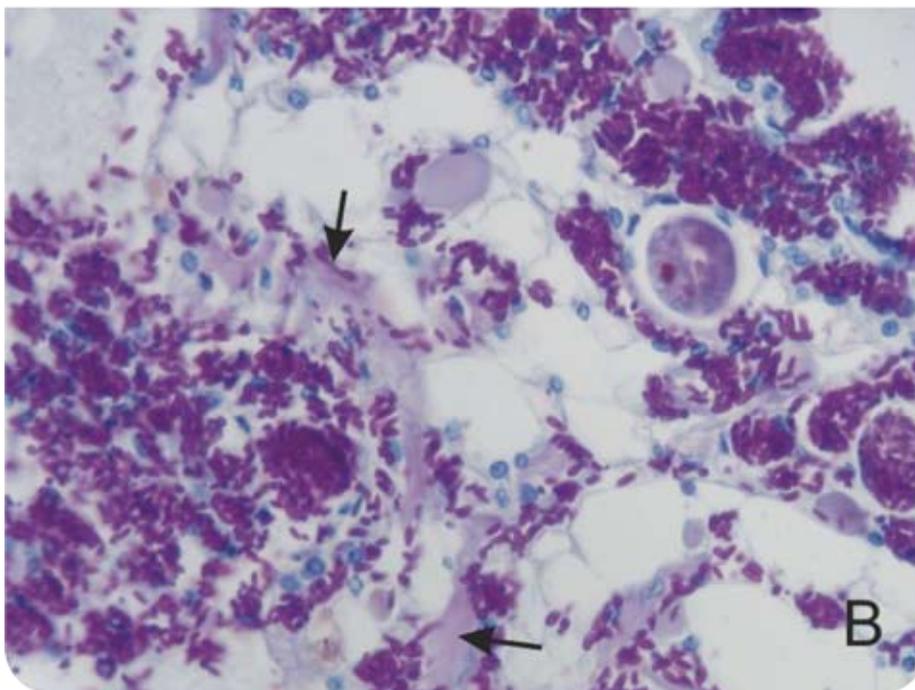
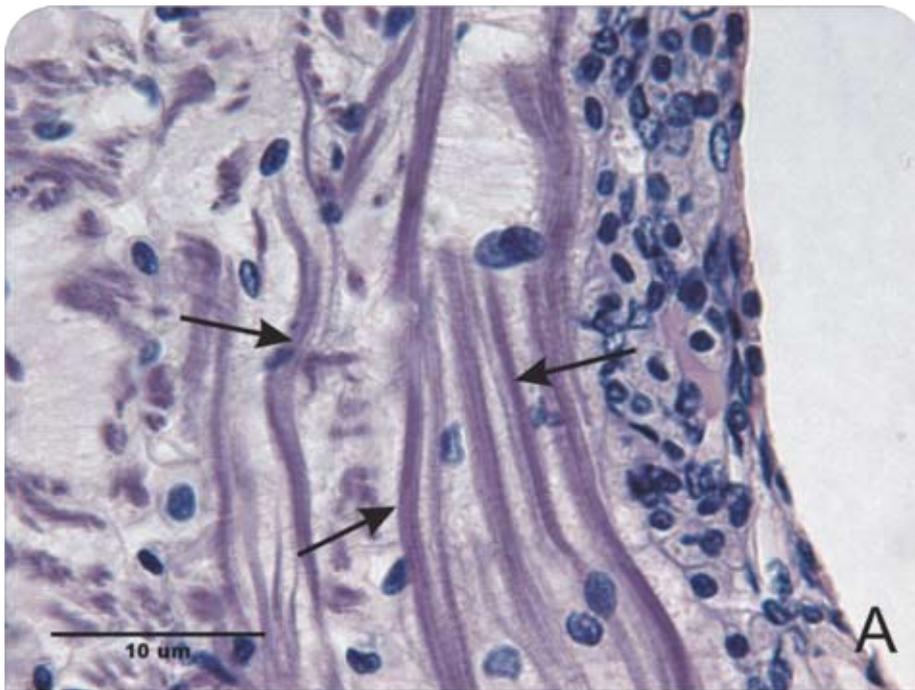


Figura 4. Microfotografia de um coração sadio (A) e outro parasitado por *Exophiala cf. psychrophila*, agente da DCL (B). Observe as fibras musculares do organismo sadio (setas em A) e seu rompimento no animal enfermo. No coração do animal enfermo (B) observa-se extensa necrose (espaço vazios). As células leveduriformes do fungo podem ser identificadas pela coloração vinho.

3B) parecem obliterados pelos corpos ovais. Necrose do epitélio branquial e das células pilares (Figura 3F, G) são observadas em extensão variável, promovendo o aparecimento de aneurismas nos

filamentos branquiais (Figura 3G). Em estados avançados da enfermidade, parece haver uma redução significativa de células sanguíneas. A presença dessas células leveduriformes na

hemolinfa produz um efeito de “lixa”, que danifica o epitélio, destruindo células pilares que sustentam e dão forma às lamelas (Figura 3). Isto pode causar aneurismas, que afetam a circulação da hemolinfa e podendo levar à obstrução das cavidades e arteríolas da hemolinfa (canais de sangue) comprometendo a circulação da hemolinfa e as trocas gasosas. Animais enfermos, portanto, parecem ter uma redução significativa de sua capacidade respiratória.

No coração, o fungo pode se apresentar de duas formas, como células leveduriformes ou hifas, causando a mesma patologia: extensa destruição tecidual e necrose. O rompimento e a diminuição da densidade das fibras cardíacas diminui a capacidade e a funcionalidade do coração (Figura 3).

No sistema nervoso, o fungo age da mesma maneira que nas brânquias e no coração, podendo estar na forma de células leveduriformes ou hifas. Ao destruir e causar necrose das células neurais, o fungo pode levar ao estado de letargia (Figura 5).

No hepatopâncreas também há uma extensa invasão por parte deste organismo que se concentram no espaço sanguíneo, localizado entre os cecos desse órgão. A presença de hifas e células leveduriformes está associada com a destruição tecidual e necrose que parece comprometer a funcionalidade deste órgão, especialmente no processo de digestão (Figura 5).

Nos demais tecidos, como

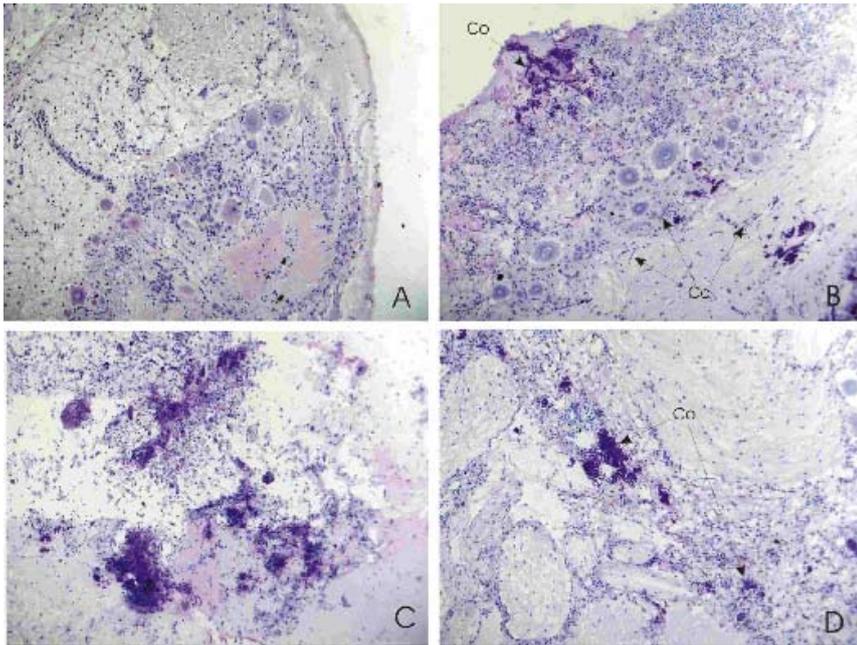


Figura 5. Microfotografia de cortes histológicos do gânglio torácico de caranguejos sadios (A) e enfermos (B-D). Observe extensa necrose associada à presença das formas infectivas do fungo da DCL facilmente identificadas pela coloração vinho. Co = células leveduriformes; cc = hifas

intestino, músculos e gônadas, a ação do fungo é muito inferior quando se comparado aos outros órgãos. Em geral, as formas infectivas são encontradas ao redor do tecido muscular, intestino e gônadas, não causando danos histológicos significativos.

O estudo histopatológico sugere que a enfermidade atinge mais diretamente os tecidos do coração e do sistema nervoso. Esta constatação é consistente com os sinais clínicos da enfermidade reportados por catadorese observados em campo pela nossa equipe. Caranguejos afetados apresentam dificuldade de locomoção (letargia) e falta de equilíbrio ao erguer as pinças, o que os faz tombar com o ventre para cima, posição na qual são geralmente encontrados mortos ou moribundos. Caranguejos moribundos são incapazes de

pinçar com suas quelas qualquer estrutura colocada entre elas.

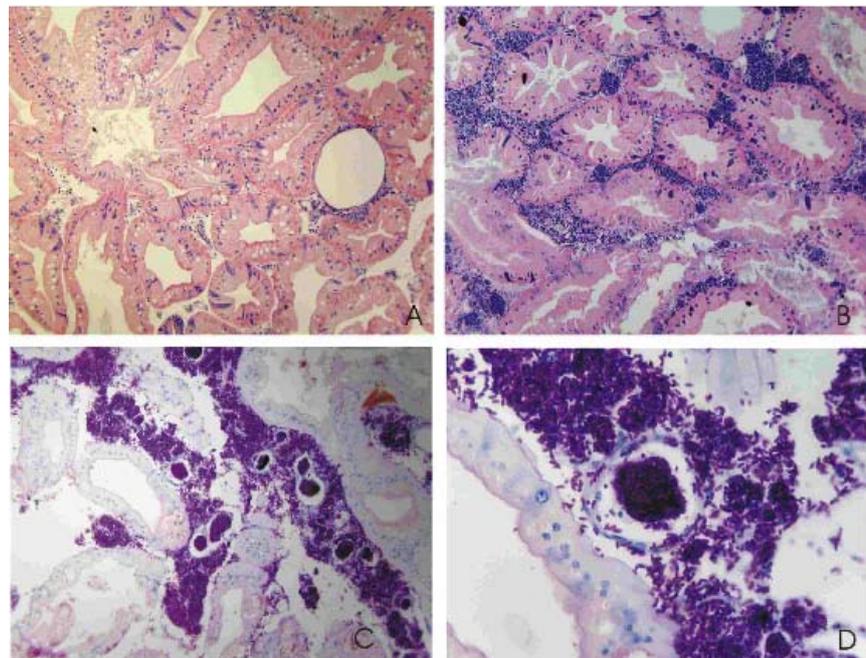


Figura 6. Microfotografia de cortes histológicos dos cecos do hepatopâncreas de caranguejos sadios (A) e enfermos (B-D). As células leveduriformes do fungo da DCL (coradas de vinho) encontram-se no espaço entre os cecos do hepatopâncreas, nunca penetrando a luz desse órgão. Nódulo (C e D) são comuns e necrose do tecido dos cecos pode ocorrer (C).

Apesar de nenhuma alteração significativa ter sido detectada no tecido muscular de caranguejos, a destruição, mesmo parcial, do sistema nervoso (através da necrose observada em diversos organismos) e a redução da capacidade cardíaca, pela redução da densidade de fibras musculares parecem justificar o cenário descrito acima. O resultado é a perda do controle muscular e deficiência (falência) cardíaca pronunciada que pode levar à morte rapidamente de animais estressados, como vem sendo reportado por catadores. Caranguejos enfermos morrem minutos após capturados. ●

MONTANDO O QUEBRA-CABEÇA

Walter A Boeger, PhD

Marcio R. Pie, MSc

Pesquisadores do GIA

O desenvolvimento deste projeto exigiu um trabalho de detetive, um verdadeiro quebra-cabeças, para reconstituir pelo menos parte da história da DCL desde as primeiras mortandades observadas no Nordeste brasileiro. Vejamos quais são as principais conclusões deste trabalho até o momento:

1. O agente causador da DCL é um fungo patogênico, *Exophiala cf psychrophila*, como demonstrado pelas análises moleculares, morfológicas e experimentais.

2. *Cladophialophora cf devriesii* também ocorre em animais doentes, especialmente no tecido do coração, mas este aparentemente representa um agente patogênico secundário.

3. A mortandade não ocorre ao longo de todo o ano, estando concentrada principalmente no verão, geralmente entre novembro e maio. Ocasionalmente, existem relatos - a maioria ainda não confirmados - de mortandades ocorrendo durante meses de inverno.

4. O fungo da DCL não é facilmente encontrado entre os períodos em que ocorrem as mortandades, tendo sido detectado apenas em caranguejos-uçá e em um único espécime de guaiamum, todos assintomáticos.

5. A DCL é uma enfermidade específica de

caranguejo-uçá. Nenhuma outra espécie desenvolve os sinais clínicos da doença.

6. Nenhum camarão de viveiro apresentou evidências de ser portador da espécie de fungo associada à DCL.

7. Não há evidências de que o fungo da DCL seja encontrado no solo ou em amostras de plantas dos manguezais ou de viveiros de cultivo.

8. A dispersão vem ocorrendo a partir do primeiro local de registro, no sentido sul-norte e, especialmente, no sentido norte-sul. Desde 1997, após seu primeiro registro no estado de Pernambuco, a DCL atingiu a região central do estado do Espírito Santo no verão de 2006. Os registros no sentido sul-norte não são claros e a DCL, mesmo em eventos registrados informalmente, não foi adequadamente diagnosticada.

9. A dispersão da DCL, a partir do primeiro registro conhecido, parece ocorrer na forma de ondas. Uma onda frontal de mortandades extensas, seguida por ondas de mortandades sequencialmente, menores até a redução ou eliminação de eventos de mortandades.

10. Catadores de Sergipe e do Rio Grande do Norte espontaneamente reportaram a existência de mortandade, semelhantes nas populações de caranguejo-uçá supostamente ocorridas há 40-50 anos.

A expressão de uma enfermidade está intimamente ligada à relação de resistência do

hospedeiro e o grau de virulência do organismo patogênico. Um enfermidade só se estabelece quando a virulência do agente patogênico é capaz de vencer a resistência imunológica do hospedeiro. Por exemplo, quando o agente patogênico apresenta uma virulência reduzida, hospedeiros saudáveis, mantidos em um ambiente livre de agentes estressantes, não desenvolvem a enfermidade, pois sua resistência impede a proliferação e ação do patógeno. Entretanto, este mesmo organismo patogênico pode vir a causar enfermidade se fatores ambientais estressantes, promovam uma redução na condição de saúde (ou higidez) da espécie hospedeira.

O nível de estresse de um organismo influencia diretamente a sua habilidade de resistir à invasão por um organismo patogênico. O estresse age negativamente sobre o sistema imune dos animais e freqüentemente tem conseqüências desastrosas (vide Figura 1).

A aparente sazonalidade e a descontinuidade dos eventos de mortandade pela DCL desde 1997 no litoral nordestino (e, agora, no litoral do Espírito Santo) são intrigantes, pois colocam em questionamento a virulência do fungo patogênico. Por outro lado, as extensas mortandades, atingindo cerca de 85% de uma população local de caranguejo-uçá, como as observadas no Nordeste, sugerem alta virulência.

Como o agente patogênico,

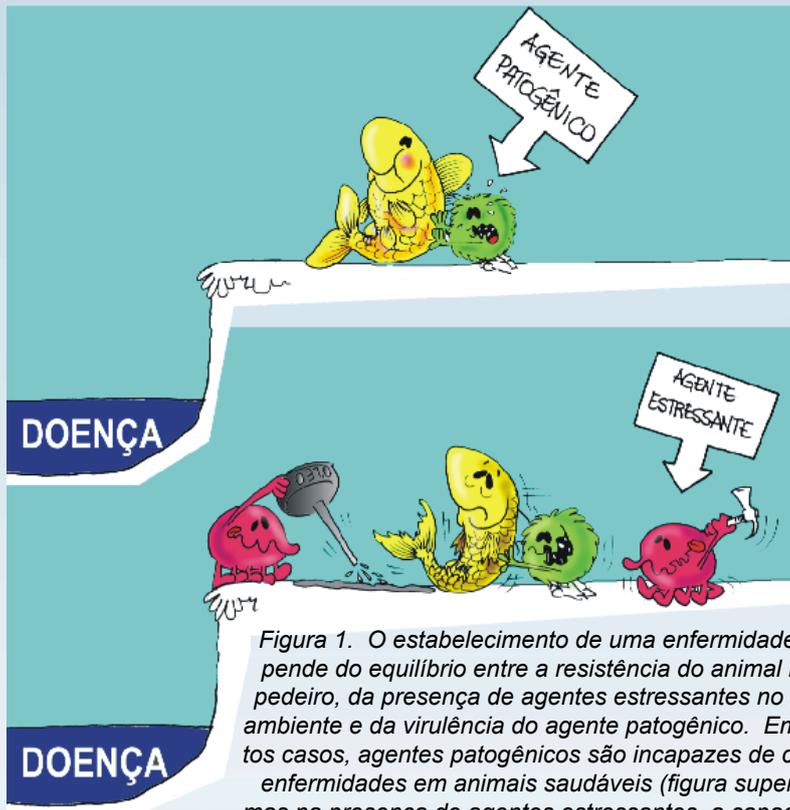


Figura 1. O estabelecimento de uma enfermidade depende do equilíbrio entre a resistência do animal hospedeiro, da presença de agentes estressantes no meio ambiente e da virulência do agente patogênico. Em muitos casos, agentes patogênicos são incapazes de causar enfermidades em animais saudáveis (figura superior), mas na presença de agentes estressantes, a capacidade de resistência do hospedeiro é reduzida, abrindo espaço para o estabelecimento da doença.

o fungo negro *E. cf psychophila*, é detectado em todos os eventos de mortandades estudados, a resposta não deve estar na variação da virulência deste organismo, mas na variação da resistência do hospedeiro, o caranguejo. Ainda, o fato das mortandades ocorrerem com maior frequência em uma determinada época do ano, especialmente no verão, sugere que algum fator sazonal estressante possa estar facilitando o estabelecimento da DCL.

Uma análise mais cuidadosa das datas de alguns eventos de mortandade parece associá-las à “andada” do caranguejo-uçá nas regiões afetadas. Por exemplo, no verão de 2005, a mortandade ocorreu cerca de 15 dias após a “andada” na região de Caravelas (BA) e, em 2006, cerca de um mês após a andada na região de Vitória (ES).

A “andada” é um evento

que ocorre anualmente no qual os caranguejos adultos saem simultaneamente de suas tocas, travam lutas e copulam. Estes são momentos de grande estresse hormonal e físico, os quais influenciam o estado fisiológico do animal e, certamente, depauperam sua habilidade de resistir à invasão e à proliferação de organismos patogênicos.

Em uma análise epidemiológica realizada durante o projeto ficou evidente que em períodos intermediários às mortandades (inverno), os fungos são encontrados quase que exclusivamente em alguns poucos caranguejos uçá, em baixa prevalência, não expressando a DCL (animais assintomáticos). Este fungo da DCL nunca foi detectado em amostras ambientais, tais como solo e folhas e outras espécies animais cultivadas (camarão de viveiro) ou nativas (ostra,

camarão, aratu). Apenas um único guaiamum apresentou evidências de conter formas do fungo neste período, mas este animal era assintomático.

A explicação para a periodicidade dos eventos de mortandade, portanto, parece mesmo residir no equilíbrio entre resistência e virulência como descrito acima. A presença do agente patogênico ao longo do ano, nos períodos entre eventos de mortandades, não é suficiente para provocar a mortandade massiva de animais em uma população devido à resistência do hospedeiro. Na presença de um evento estressante, como o da “andada” (ou outro que produza resultados semelhantes), a resistência natural dos caranguejos é reduzida e o agente patogênico é capaz de dispersar entre indivíduos da população iniciando a epidemia. Após um período de crescimento do fungo, que conforme experimentos laboratoriais e observações de campo, pode variar de 15-30 dias, ocorre o pico da mortandade, que pode se estender por um período relativamente longo devido a diferenças individuais dos hospedeiros.

Uma hipótese sobre a origem da DCL, parece mais difícil de propor. *Exophiala cf psychophila*, não parece ser uma espécie comum no meio ambiente, como outras espécies que compõem este gênero de fungos. A DCL é exclusiva do caranguejo-uçá. Amostras de camarões de viveiro, de solo e folhas obtidas de fazendas de camarão localizadas em regiões nas quais a DCL promoveu mortandades extensas, foram todas negativas, servindo de

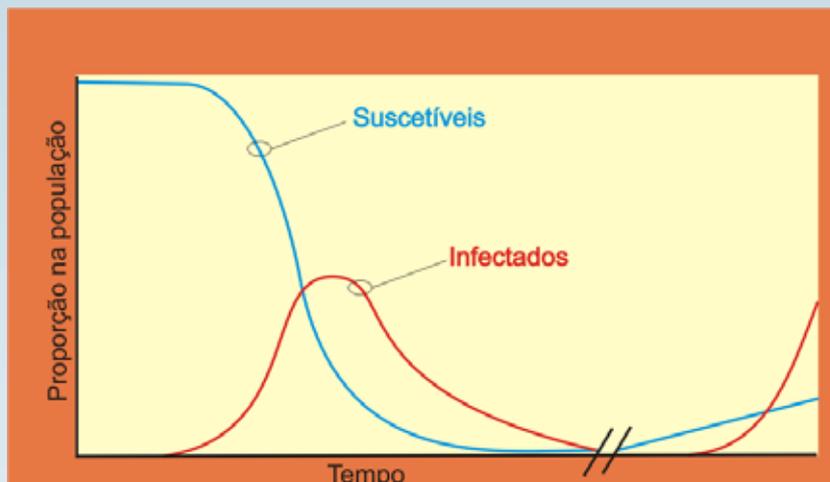


Figura 2. A DCL parece seguir a dinâmica SIR (Suscetíveis-infectados-recuperados). A enfermidade só se estabelece quando um certo percentual da população é suscetível à DCL. Quando o evento epidêmico se estabelece, animais infectados morrem ou se tornam resistentes e a epidemia termina até que um novo ciclo se complete, quando suscetíveis começam a aparecer em altas proporções na população.

forte evidência que, ao contrário do que alguns sugerem, esta atividade não pode ser responsabilizada pela introdução do agente patogênico.

Inúmeras possibilidades, muitas vezes dificilmente testáveis, foram consideradas inicialmente nesse estudo, tais como a introdução do agente patogênico através de água de lastro, a mutação de uma espécie local, dentre outras. Entretanto, informações recebidas de comunidades marisqueiras, especialmente de catadores mais velhos nas comunidades sugerem uma outra explicação, aparentemente mais factível, sobre a origem da DCL.

Catadores de Sergipe e do Rio Grande do Norte, espontânea e independentemente afirmam que mortandades semelhantes de caranguejo-uçá ocorreram há mais de 40 anos atrás, o que sugere um caráter cíclico para a enfermidade. Associada às evidências que indicam a existência de resistência de alguns

organismos à enfermidade, esta informação sugere que a DCL comporta-se como enfermidades com a dinâmica conhecida como “**suscetíveis-infectados-recuperados**” (SIR) (vide Figura 2).

Sob a dinâmica SIR, oscilações na incidência de enfermidades podem ser determinadas por uma imunidade prolongada subsequente às infecções (combinadas com um período relativamente curto de infecção). Ciclos ocorrem porque períodos de grande epidemias extinguem-se através da eliminação do “suprimento” de organismos suscetíveis. O número de organismos nos grupos dos suscetíveis cresce gradualmente, eventualmente até uma proporção suficientemente grande a permitir outros grandes eventos epidêmicos da enfermidade.

Outras doenças que apresentam este tipo de dinâmica apresentam ciclos de longevidade variada. A sífilis

humana, por exemplo, torna-se epidêmica a cada 8-11 anos. No caso da DCL, os ciclos epidêmicos parecem ser bem mais longos, de 40-50 anos, conforme as informações de catadores. Esta elevada extensão do ciclo sugere que a resistência e a suscetibilidade podem ser uma característica genética, transmitida hereditariamente dos pais para a prole. Dessa maneira, o acúmulo de organismos suscetíveis exigiria um número elevado de gerações até que fosse possível um novo evento epidêmico, com o acúmulo de uma alta proporção de animais suscetíveis. Estas hipóteses estão sendo incorporadas em uma simulação computacional que permitirá uma maior compreensão dos eventos associados à introdução, distribuição espacial e temporal das mortandades.

Se a hipótese da dinâmica SIR e da influência de eventos estressores facilitando o aparecimento de epidemias de DCL em caranguejo-uçá estiver correta, como indicam as evidências, os eventos de mortandades devem encontrar-se em declínio, nas regiões onde os primeiros registros de mortandades foram detectados. De fato, isso parece estar ocorrendo em diversos manguezais nordestinos. Um monitoramento extenso do agente da DCL, utilizando protocolos diversos de prospecção, seria uma forma de determinar o risco anual de cada sistema estuarino e seus manguezais. ●



**A Universidade Mais
Próxima da Sociedade**



Juvenis de caranguejo-uçá produzidos em laboratório.

CARANGUEJO-UÇÁ: A PRODUÇÃO EM LABORATÓRIO

Ubiratã A. T. da Silva, MSc
Antonio Ostrensky, Dr
Robson Ventura, MSc
Angelo Francisco dos Santos, Bsc
Walter A. Boeger, Phd

O caranguejo-uçá é o maior crustáceo encontrado nos manguezais brasileiros. Sua carne é adocicada e muito saborosa, o que faz de sua captura uma atividade econômica muito importante nas regiões litorâneas. Porém, já existe uma crescente preocupação com a redução dos seus estoques naturais, não só pela destruição de seus habitats e pela captura desenfreada a que está sendo sujeito, mas também pelo surgimento de uma enfermidade chamada “Doença

*Esta matéria foi veiculada na revista “Panorama da Aqüicultura”, MAIO/JUNHO 2006.

do Caranguejo Letárgico” (DCL). Desde 1997, essa doença vem provocando grandes mortandades de caranguejo-uçá em grande parte da Região Nordeste. Os problemas relacionados ao caranguejo-uçá vêm forçando as instituições de pesquisa e o poder público a despender um enorme esforço para o manejo e recuperação das populações afetadas. Trabalhos neste sentido vêm sendo realizados desde 2001, pelo Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais (GIA), com o objetivo de recuperar áreas de manguezal onde as populações de caranguejo mostram estar declinando. Para isso, foram desenvolvidas técnicas inéditas de larvicultura em larga escala da espécie, que vêm se tornando uma ferramenta valiosa para o manejo de populações naturais. O caranguejo-uçá é um

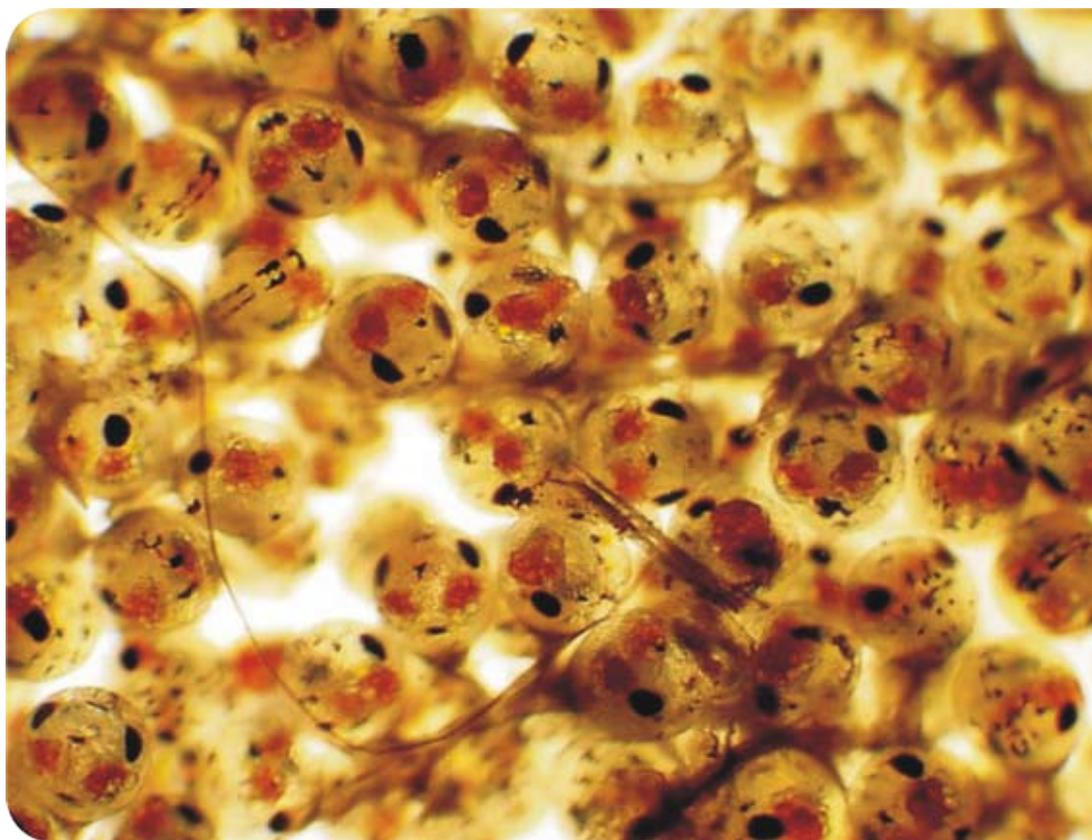
dos principais recursos pesqueiros explorados pelas populações que vivem próximas a estuários. Essa espécie pode ser encontrada desde o norte de Santa Catarina até o Estado norte-americano da Flórida. Na fase adulta, o caranguejo-uçá chega a atingir um tamanho considerável - até 10 cm de largura de carapaça e mais de 30 cm de envergadura. A sua carne é muito apreciada e sua captura é relativamente fácil, principalmente durante o período reprodutivo. Como não exige equipamentos ou artes de pesca sofisticadas, a cata do caranguejo é uma prática acessível às camadas mais pobres das populações litorâneas e, com isso, a pressão sobre esse recurso pesqueiro, principalmente em torno das grandes cidades, é muito grande. A cata do caranguejo, dessa forma, acaba funcionando como

uma “válvula de escape” à falta de emprego e opção de geração de renda para essas populações. No entanto, há alguns anos é possível observar uma tendência de redução dos estoques do caranguejo-uçá em grande parte dos manguezais brasileiros. Até mesmo o tamanho médio dos caranguejos capturados vem decrescendo ano após ano. Preocupados com estes fatos, a comunidade científica e os órgãos ambientais vêm realizando esforços para ampliar o conhecimento sobre a biologia do animal e tentando implementar medidas administrativas e legais para tentar reverter este quadro. Diversos encontros anuais, reunindo catadores de caranguejo, membros da comunidade científica e agentes de fiscalização foram realizados e, a partir daí, os moldes de portarias como a de Nº 52/2003, que regula a captura e comercialização do caranguejo-uçá no sul do Brasil, foram estabelecidos. Apesar da implementação de medidas mais rígidas de controle, tais como tamanho mínimo de captura e períodos de defeso, os estoques continuam a decair. Outros fatores como o crescimento das cidades em torno dos manguezais, acidentes ambientais e, recentemente pelo aparecimento de uma enfermidade altamente letal para populações de caranguejo-uçá, vêm demonstrando que apenas a regulamentação da cata do caranguejo é insuficiente para garantir a sustentabilidade da exploração desta espécie pelas populações ribeirinhas por um longo tempo.

A Doença do Caranguejo Letárgico – DCL. Desde 1997, episódios de mortandades em massa de populações de caranguejo-uçá vêm sendo registrados na região Nordeste.

Em várias cidades turísticas, como Salvador e Aracaju, por exemplo, a redução na oferta de caranguejo nos bares e restaurantes já se faz sentir na

a maioria dos próprios catadores profissionais desconhece este fato. O longo tempo necessário para o crescimento até seu tamanho comercial dá uma idéia de sua fragilidade ambiental. Por este mesmo motivo, o cultivo comercial e econômico do caranguejo-uçá é tido como totalmente inviável. A alternativa está no gerenciamento e na manutenção dos estoques para



Larvas de uçá dentro dos ovos prestes a eclodir.

forma de um drástico aumento dos preços, criando até mesmo um mercado para a importação de caranguejos de outras regiões do país ainda não afetadas pela doença.

Repovoamento. Poucas pessoas sabem que o caranguejo-uçá demora cerca de seis ou sete anos até atingir o tamanho mínimo permitido para sua captura (seis centímetros de comprimento de carapaça). Mesmo

captura extrativista. Porém, uma terceira alternativa, para se somar às já tradicionais, vem sendo desenvolvida pelo GIA/UFPR: a reposição de estoques depletados através da liberação de formas jovens, ou seja, pós-larvas e juvenis produzidos em laboratório. O repovoamento procura explorar algumas das lacunas reprodutivas da espécie, que apresenta alta prolificidade, mas baixíssimas taxas de sobrevivência larval no

ambiente natural. Em laboratório, através do uso de tecnologias avançadas, é possível obter índices de sobrevivência centenas e até milhares de vezes superiores àqueles obtidos naturalmente. Essas larvas podem ser utilizadas para recompor áreas alteradas por ações antrópicas ou naturais. Entretanto, o uso das técnicas de repovoamento é muitas vezes visto pela população e, por isso mesmo, também pelos administradores públicos, como uma panacéia – uma solução para todos os males. Apesar de sua eficiência já ter sido comprovada para diferentes espécies em países como Japão, Noruega e Estados Unidos, existem muitos exemplos nos quais as técnicas de repovoamento, até por terem sido ex a g e r a d a m e n t e simplificadas, resultaram em exemplos negativos até hoje lembrados e explorados pelos adversários da idéia.

Apesar da maior consciência que se tem atualmente de que a interação entre uma multitude de fatores ambientais exerce enorme influência nos resultados dos esforços de repovoamento, muitas tentativas sem o necessário critério continuam a ser realizadas, ano após ano, atraídas principalmente pelo clamor popular, mas também pelo desejo dos governantes em dar uma resposta rápida às demandas, tanto sociais como ambientais.

O que o GIA tem feito

é justamente desenvolver, testar e validar a tecnologia de repovoamento do caranguejo-uçá de uma maneira científica. O início de todo o processo de repovoamento

Primeiros passos. Em janeiro de 2000, um acidente na refinaria Duque de Caxias foi responsável pelo derramamento de grandes



Larvas Zoea do uçá

em um determinado local passa primeiramente por um diagnóstico muito preciso da situação da área-alvo. Dentre os aspectos que são avaliados estão a identificação do agente estressor, a dimensão do impacto e a capacidade de regeneração natural dessa área. O desenvolvimento dessa tecnologia tem sido possível graças ao financiamento da Petrobrás e da Secretaria de Ciência e Tecnologia (SETI) do governo do Estado do Paraná.

quantidades de óleo cru na Baía de Guanabara, no Rio de Janeiro. O óleo atingiu diversas praias e ilhas, mas principalmente os manguezais das reservas ambientais de Guapimirim, no fundo da baía. Como resposta ao acidente, a Petrobras apoiou as primeiras pesquisas desenvolvidas pelo GIA para o desenvolvimento de uma tecnologia para produzir larvas de caranguejo-uçá em larga escala. O projeto foi realizado em um pequeno laboratório no município

de São Mateus, ES. As primeiras tentativas foram frustrantes, pois ainda não se conhecia o momento exato em que as eclôsões ocorreriam e nem como manter as fêmeas em cativeiro. Conversando com os catadores, percebeu-se que as eclôsões ocorriam em sincronia com os ciclos lunares e que a manutenção das fêmeas em cativeiro por longos períodos era desnecessária.

A partir daí, as fêmeas ovadas somente eram trazidas ao laboratório alguns dias antes da lua cheia ou nova. Com isso, a sobrevivência das fêmeas foi maximizada permitindo, finalmente, que grandes quantidades de larvas na fase inicial, ou zoea I, fossem obtidas. As fêmeas eram, então, devolvidas, após a eclôsão, para o mesmo manguezal do qual foram capturadas.

Larva zoea. A partir do momento em que foi possível obter uma quantidade suficiente de larvas, no estágio de zoea I, a maior preocupação da equipe de pesquisadores passou a ser o alimento mais indicado para cada estágio larval. Diversos experimentos foram necessários para encontrar alimentos vivos que pudessem ser aceitos pelas larvas. À medida que o desenvolvimento larval avançava, algumas enfermidades passaram a surgir e precisaram ser controladas com ajustes do manejo de rotina, até que finalmente os primeiros lotes do último estágio larval, conhecido como megalopa, puderam ser produzidos em grande quantidade. Neste primeiro ano do projeto, cerca de dois milhões de megalopas foram produzidas.

As larvas foram

transportadas para o Rio de Janeiro e liberadas nos manguezais que margeiam a Refinaria Duque de Caxias e na unidade de proteção ambiental de Guapimirim.

A partir do sucesso inicial, que na verdade se restringiu mais ao desenvolvimento de uma tecnologia básica para a larvicultura da espécie do que no repovoamento em si, outros esforços foram realizados, também em parceria com a Petrobras, nos anos seguintes. A continuidade do processo de desenvolvimento da tecnologia para o repovoamento do caranguejo-uçá consistiu em resolver gargalos tecnológicos para aumentar as taxas finais de sobrevivência durante a larvicultura, o que implicava em abandonar definitivamente o modelo de larvicultura de camarões e desenvolver um modelo próprio para a produção de larvas de caranguejo-uçá. Atualmente, as larviculturas estão sendo realizadas no Laboratório de Pesquisas de Organismos Aquáticos (LAPOA), que pertence ao próprio GIA, localizado no campus da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba, a 130 km do litoral paranaense. Devido à distância com o mar, a água marinha utilizada no laboratório é transportada por caminhões-pipa e mantida por meio de sistemas de recirculação por filtragem biológica.

Apesar do desafio que significa produzir organismos marinhos tão longe do mar, as larviculturas têm sido realizadas com grande êxito, já que as dificuldades exigiram refinamento das técnicas de produção. A metodologia de produção de organismos-alimento, o esquema de alimentação, as trocas de água

e o manejo em geral, acabaram por atingir um alto grau de sofisticação e de especialização, de tal forma que grandes quantidades de larvas vêm sendo liberadas em regiões previamente estudadas.

Larvicultura. Para a realização das larviculturas, fêmeas ovadas de caranguejo-uçá são coletadas dos manguezais nos dias que antecedem a lua cheia e nova. Trazidas até o LAPOA, elas são desinfetadas em solução de iodo e formalina e acondicionadas em tanques especiais para eclôsão. As larvas, que após a eclôsão formam nuvens na coluna d'água, são facilmente atraídas por uma fonte luminosa e retiradas dos tanques. Após serem contadas por amostragem, são então transferidas para os tanques de larvicultura.

Uma seqüência de diferentes alimentos é utilizada para cada estágio. Inicialmente, para o primeiro estágio larval, ou zoea I, fornecia-se microalgas móveis, como as *Tetraselmis* spp. A partir de zoea II, o rotífero da espécie *Brachionus plicatilis* era adicionado à dieta e por fim, náuplios de artêmia, eram fornecidos após o estágio de zoea V.

Atualmente, estão sendo testadas diferentes espécies de microalgas para alimentação das larvas. Na fase final do processo ainda são fornecidos náuplios de artêmia como alimento suplementar, porém, devido ao alto custo do cisto de artêmia, foram testadas algumas espécies de copépodes que demonstraram grande potencial e deverão ser utilizadas mais freqüentemente nos próximos ciclos de produção. O cultivo larval demora cerca de



Vista interna do LAPOA: tanques de produção de larvas de uçá

30 dias. Durante este período as larvas passam por seis estágios de zoea até realizarem a metamorfose para megalopa. Normalmente, a maioria das larvas atinge a fase de megalopa já no vigésimo quinto dia de larvicultura, mas ainda não estão prontas para o recrutamento. Isto é, as megalopas ainda não estão preparadas para enfrentar as condições encontradas nos rios que permeiam os manguezais.

Somente após cerca de cinco dias desta última ecdise, a megalopa passa a tolerar variações de salinidades mais extremas e começa a procurar ativamente o sedimento, detalhe que indica o momento correto para sua liberação no ambiente. Este período adicional no laboratório é muito importante, pois minimiza também as perdas por predação. As larvas,

assim que liberadas, permanecem o menor tempo possível na coluna d'água antes de se dirigirem para o sedimento.

Experimentos de campo demonstraram que imediatamente após a liberação, as megalopas de *U.cordatus* já são capazes de cavar suas tocas, diferentemente do que ocorre com várias outras espécies de caranguejos que cavam tocas ou se enterram para se proteger de predadores somente após várias mudas subseqüentes à sua metamorfose para o estágio juvenil. Esta diferença básica explica porque o repovoamento de caranguejo-uçá pode ser realizado liberando-se megalopas e não somente juvenis crescidos, como é o caso dos programas de repovoamento de siri, realizados no Japão e Estados Unidos.

Alguns dias após a liberação, a larva, já dentro de uma pequena toca, realiza a metamorfose para o primeiro estágio juvenil. A partir daí, o caranguejinho aprofunda drasticamente a sua toca, ficando definitivamente protegido da predação inicial.

Atualmente, as taxas médias finais de sobrevivência larval em laboratório variam entre 10 a 15%. A maior perda de larvas se dá no momento da metamorfose de zoea VI para megalopa. Este vem sendo o maior gargalo tecnológico enfrentado atualmente pela equipe do GIA. O problema é muito semelhante ao que ocorre em larviculturas de várias espécies de crustáceos em outras partes do mundo e que recebeu o nome de MDS (Molt Death Syndrome). As causas da MDS ainda não são claras

e sua solução demanda a realização de mais pesquisas científicas sobre o assunto.

Resultados. Desde o início do projeto até hoje já foram liberadas mais de seis milhões de megalopas no ambiente natural. As liberações ocorreram, além da Baía de Guanabara, nas baías de Antonina e Guaratuba, no Estado do Paraná, entre 2003 e 2006. Em liberações experimentais, realizadas em áreas monitoradas, foram obtidas taxas de colonização próximas à 100% e de sobrevivência média de 27%, seis meses após a liberação das megalopas. Após este tempo os caranguejos haviam atingido cerca de 1,0 cm de comprimento de carapaça.

As pesquisas não podem parar. Além das pesquisas em laboratório, os estudos do GIA têm se concentrado na compreensão dos mecanismos de adaptação das megalopas liberadas ao ambiente natural. Estudos comparativos entre as taxas de sobrevivência de larvas da natureza e das larvas produzidas em laboratório estão sendo realizados, para quantificar, de forma mais precisa, a eficiência do repovoamento. Também estão sendo realizados estudos comportamentais, comparando os recrutas produzidos em laboratório com os obtidos diretamente do ambiente natural.

Além disso, estão sendo desenvolvidas pesquisas que visam quantificar os efeitos da predação de peixes e outros animais da fauna estuarina sobre as megalopas liberadas. Porém, apenas o monitoramento a longo prazo pode avaliar o sucesso do empreendimento. Como o tempo

necessário para atingir o tamanho comercial é muito longo, as técnicas clássicas de liberação e recaptura, utilizando marcadores físicos, são inadequadas. A observação de incrementos populacionais perceptíveis pode demorar mais de uma década. Por este motivo, o GIA vem utilizando a técnica hoje considerada mais adequada: a aplicação de marcadores moleculares do tipo micro-satélites. Após a eclosão das larvas no laboratório, o material genético de todas as fêmeas é coletado, fixado e armazenado. Logo após isso, as fêmeas são devolvidas ao ambiente. Após as larviculturas, apenas o material genético daquelas fêmeas cujas larvas forem efetivamente liberadas será processado e os dados obtidos armazenados em um banco de dados. Futuramente, amostragens de caranguejos em áreas utilizadas para liberação das larvas irão permitir a comparação do perfil genético destes animais com os das fêmeas utilizadas na larvicultura, detectando os animais produzidos em nosso laboratório. Isso dará aos pesquisadores uma idéia mais precisa da taxa de sobrevivência a médio e longo prazo das larvas liberadas e da capacidade de dispersão da espécie.

A mesma tecnologia está sendo também utilizada para investigar a existência de diferentes sub-populações de caranguejo-uçá e a origem genética dos recrutas capturados no ambiente natural, de forma a esclarecer as inter-relações populacionais e determinar as possíveis áreas prioritárias para a preservação dentro dos sistemas estuarinos.

Considerações finais. Não se

deve negligenciar o fato de que a recuperação de estoques de caranguejo-uçá depende de ações multidisciplinares, envolvendo estratégias de manejo do recurso e de manutenção da integridade dos habitats. Porém, em áreas onde a população já foi muito afetada, são necessárias medidas remediadoras mais incisivas. O repovoamento pode ser uma importante ferramenta para a recuperação de áreas com reconhecido declínio populacional. Seus benefícios estão ainda sendo investigados, porém os resultados obtidos até aqui são bastante animadores.

É importante ressaltar que todo o trabalho do GIA está voltado à criação de uma tecnologia responsável, que não se limite à simples liberação de larvas no ambiente natural e nem tem por objetivo substituir as medidas de manejo atualmente estabelecidas, mas sim, desenvolver meios concretos para auxiliar as populações de caranguejo-uçá a suportar os exageros da população humana.●



A GENÉTICA, A RECUPERAÇÃO E O MANEJO DO CARANGUEJO-UÇÁ NOS MANGUEZAIS DE SERGIPE

Marcio R. Pie, MSc
José Francisco, MSc
Walter A. Boeger, PhD
Pesquisadores do GIA

Uma vez descoberta que a DCL tem sua origem em uma doença infecciosa, uma pergunta óbvia vem à mente: o que pode ser feito para solucionar esse problema? Assim como toda questão complexa, provavelmente não há uma “bala de prata”, uma resposta simples para essa pergunta. É necessário levantar e avaliar cada alternativa para minimizar o impacto da DCL em populações naturais, sua eficiência e sua viabilidade.

Uma possibilidade seria o combate do fungo na natureza, embora uma breve reflexão indique que tal alternativa é inviável. As regiões de manguezais apresentam uma dinâmica complexa de marés e entrada e saída de matéria orgânica nos estuários, além da interação entre todos os organismos que integram esta biota. Um dos processos mais importantes para a manutenção do balanço desse ecossistema é a ciclagem de nutrientes, ou seja, a decomposição da matéria orgânica animal e vegetal e sua disponibilização para que novos organismos possam crescer e se desenvolver. Um elo importante nesse processo é o papel do caranguejo na coleta de folhas e seu processamento dentro de suas tocas. Nestes locais, as folhas são decompostas por fungos e outros microorganismos, e os nutrientes são então liberados para o ambiente. Uma substância como um antibiótico que atacasse o fungo

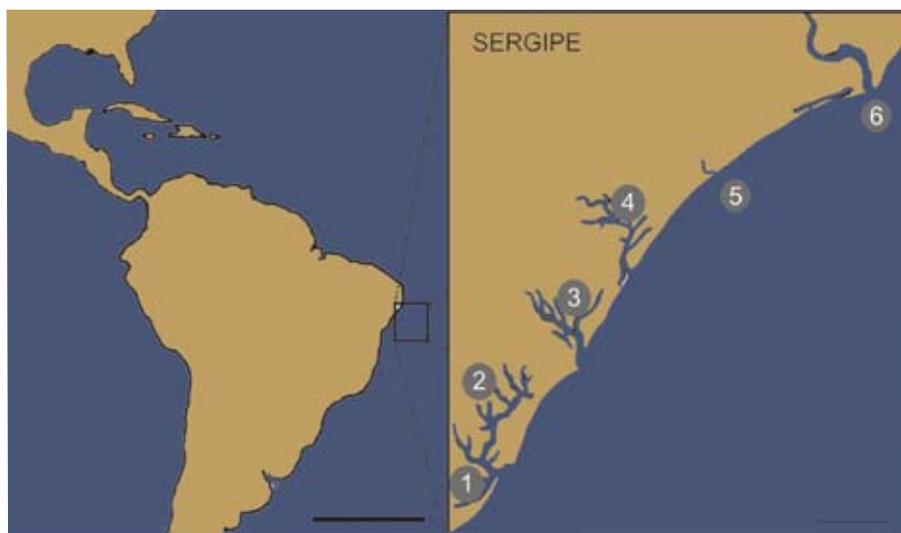


Figura 1. Estuários amostrados no Estado de Sergipe. 1. Rio Real. 2. Rio Piauí. 3. Rio Vaza-Barris. 4. Rio Sergipe. 5. Rio Japarutuba. 6. Rio São Francisco

da DCL muito provavelmente também afetaria outros fungos presentes no ambiente que são fundamentais para a degradação dessa matéria orgânica. Isso poderia causar danos ainda maiores, não só para as populações do caranguejo-uçá, mas também para outras espécies animais e vegetais dos manguezais.

Uma outra possibilidade seria o repovoamento das regiões onde houve mortandades expressivas com larvas do caranguejo-uçá.

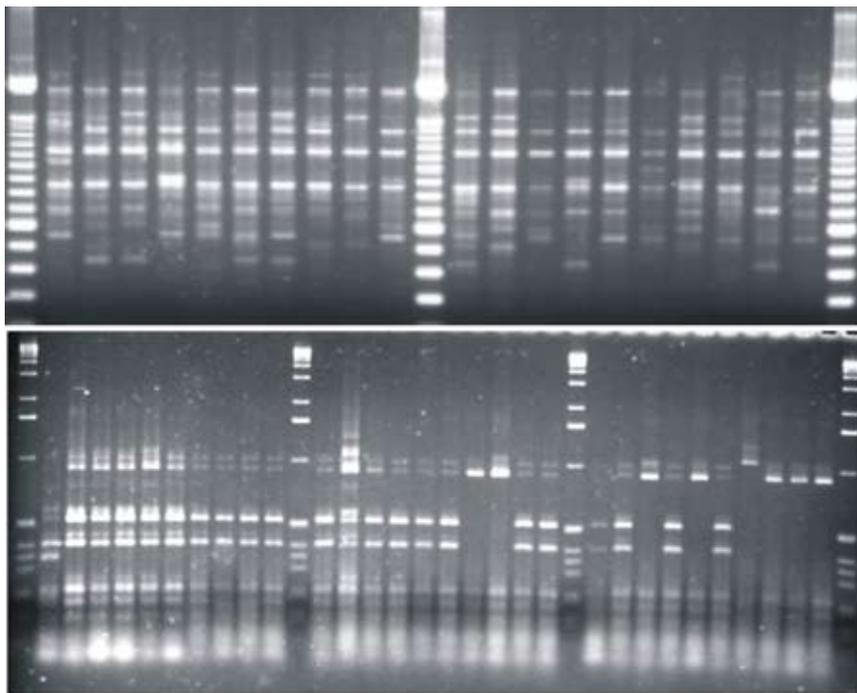
Um procedimento semelhante poderia ser usado nas regiões afetadas pela DCL no Nordeste brasileiro, permitindo uma aceleração na regeneração dos estoques naturais. A viabilidade técnica dessa alternativa têm sido melhorada a cada ano pelas quantidades cada vez maiores de larvas que são produzidas e liberadas. Até hoje já foram liberadas aproximadamente 3 milhões de larvas nos estuários

do Paraná. Além disso, um aumento no recrutamento de jovens caranguejos é uma alternativa muito mais barata e simples do que atacar o fungo natureza, além de não apresentar nenhum “efeito colateral” sobre outros organismos dos manguezais.

Uma preocupação associada ao repovoamento é a necessidade da manutenção da integridade genética das populações naturais do caranguejo-uçá. As novas larvas a serem introduzidas nesses ambientes necessitam possuir um perfil genético compatível com as populações receptoras, sob o risco de causar danos ainda maiores por diversos fatores, tais como depressão por endocruzamento, redução da variabilidade genética, etc. Para evitar esses danos, estudos realizados

pela equipe do GIA e financiados pelo SEBRAE-SE buscaram descrever os perfis genéticos das populações do caranguejo-uçá nos seis estuários do estado de Sergipe: Rio São Francisco, Rio Japarutuba, Rio Sergipe, Rio Vazabarris, Rio Piauí e Rio Real (Figura 1), sendo que dez indivíduos foram coletados em cada estuário.

Dois tipos de marcadores genéticos foram usados para determinar e comparar as identidades genéticas das populações de caranguejo-uçá dos diferentes sistemas estuarinos do estado de Sergipe. Ambos os métodos indicaram uma considerável variação genética entre os indivíduos estudados sugerindo que os estoques encontram-se em bom estado de conservação sob o ponto de vista genético. Além disso, essa diversidade genética distribuiu-se por todos os estuários estudados, ou seja, não houve evidência de que estuários distantes geograficamente apresentam perfis genéticos distintos. Assim, apesar de geograficamente distantes entre si, as populações de uçá dos diversos estuários sergipanos



Géis de agarose evidenciando a identidade genética (bandas) de indivíduos de caranguejo-uçá de Sergipe. Cada coluna representa um animal. O gel superior foi obtido através da técnica de RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) e o de baixo com RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

podem ser considerados uma grande população de animais que se inter cruzam.

As implicações destes resultados para o manejo de populações naturais do caranguejo-uçá são evidentes. Primeiramente, a falta de diferenciação entre os estuários de Sergipe indica que há um fluxo gênico substancial e n t r e estuários e, portanto, todos os estuários

sergipanos devem ser considerados como uma única unidade de manejo. Além disso, larvas oriundas de fêmeas de qualquer estuário de Sergipe podem ser utilizadas para repovoar qualquer outro estuário sem efeitos deletérios às populações locais, mantendo suas integridades genéticas.

O uso de técnicas de repovoamento usando larvas do caranguejo-uçá pode representar uma das principais ferramentas para minimizar o efeito de mortandades pela DCL por acelerar os processos de regeneração das populações locais de forma eficiente e barata. ●





PROJETO CULTIMAR

MINIMIZANDO PREJUÍZOS SOCIAIS, AUMENTANDO A QUALIDADE DE VIDA

Antonio Ostrensky, Dr
Leandro Angelo, Msc

Produzir produtos marinhos de qualidade certificada. Conjugar produção com sustentabilidade ambiental.

Gerar renda, valorizando a cultura e resgatando as tradições das comunidades litorâneas.

Educar, para que essas comunidades possam ter a verdadeira liberdade para decidir o rumo de seus próprios destinos.

Esses são os principais norteadores do Cultimar, um projeto desenvolvido pelo Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais GIA da Universidade Federal do Paraná, em parceria com a Petrobrás.

A proposta, bastante



inovadora, concilia ações no campo da maricultura, turismo, educação ambiental e cultura.

O QUE É O CULTIMAR

O Cultimar começou a ser implementado em 2005, tendo como base o litoral do estado do

UMA PARCERIA ENTRE A UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ E A PETROBRAS QUE UTILIZA A MARICULTURA COMO FERRAMENTA PARA O DESENVOLVIMENTO SOCIOECONÔMICO.

Paraná, e, mais especificamente, as comunidades de Guaratuba e Ilha das Peças. No entanto, a proposta é criar uma metodologia para o desenvolvimento da maricultura que possa ser aplicada em qualquer região brasileira, sempre respeitando as peculiaridades e vocações locais.

Neste conceito de projeto trabalha-se o sistema de produção de uma forma holística, envolvendo, antes de qualquer coisa, a criação e o fortalecimento de uma marca (Cultimar);

o agrupamento de diversos setores da cadeia produtiva em torno dela; a regularização legal das áreas de cultivo; o apoio para a aplicação de técnicas mais adequadas de produção; a análise microbiológica das ostras, camarões e mexilhões produzidos, garantindo total



qualidade e segurança alimentar aos consumidores.

Além disso, restaurantes locais, que têm nos turistas que visitam a região o seu público alvo, também são incentivados a participar do projeto Cultimar, como forma de reduzir o número de atravessadores no processo de produção. Os restaurantes participantes são identificados com a logomarca do projeto, atestando aos consumidores que as ostras ali comercializadas



passaram por um rigoroso controle de qualidade e que são produzidas de forma socialmente responsável e ambientalmente correta.

Além disso, as comunidades tradicionais do litoral brasileiro têm seus ritmos, cultura, tradições, modos e objetivos de vida absolutamente próprios e geralmente distintos daqueles que caracterizam as pessoas ou as comunidades dos grandes centros urbanos. Por isso, querer implementar projetos de produção sem levar em conta tais características específicas é o primeiro passo para que o projeto jamais atinja seus objetivos.

Concomitantes às ações desenvolvidas nos cenários comercial e técnico, são estabelecidas ações de educação ambiental, que integram questões sociais, ambientais e culturais das comunidades participantes. A proposta é fazer com que essas comunidades se sintam, de fato, estimuladas a abraçar essa idéia, de produzir de forma sustentável.

EDUCAÇÃO AMBIENTAL

O projeto pretende contribuir não apenas com o desenvolvimento dos aspectos econômicos e técnicos relacionados aos cultivos

de ostras nas comunidades envolvidas, mas também com os aspectos sociais e culturais, trabalhando tópicos de conscientização e educação ambiental.

Para o desenvolvimento dessas ações, o projeto atua em diferentes esferas: educação ambiental formal, educação ambiental não formal e informal. A educação ambiental formal visa o trabalho com as escolas da região (foco na educação formal da Ilha das Peças, com realização de oficinas para



crianças e professores) e o desenvolvimento de material didático para escolas que visitam os locais de cultivo.

Já a educação ambiental não formal, visa a realização de oficinas com crianças e adolescentes, oficinas estas voltadas para a percepção do meio e discussão da problematização gerada, com inserção de aspectos culturais e atividades recreativas.

A educação ambiental informal, por sua vez, está ligada à conscientização dos turistas, que é trabalhada por meio de material impresso e visitas aos cultivos.

MAR E CULTURA

O Cultimar desenvolve nas comunidades onde atua, um programa paralelo ao de Educação Ambiental, programa este chamado de “Mar e Cultura”, que promove atividades de resgate da cultura caiçara paranaense, focando artes de pesca, Fandango (música típica do litoral do Paraná), lendas e artesanato local.

Atualmente, a linha “Mar e Cultura” trabalha por meio de oficinas, exibição de filmes e produção de imagens. O programa aborda aspectos relacionados ao histórico de cada região, envolvendo resgate de lendas locais; histórico da pesca e artes utilizadas; exploração dos recursos naturais e modificação de métodos ao longo do tempo; transformação dos meios de transporte e influência nas atividades econômicas; sistema de uso da terra; atividades culturais como artesanato e Fandango de Mutirão, além de aspectos atuais, como modelos econômicos vigentes e necessidade de existência de áreas protegidas.

As oficinas são ofertadas na própria comunidade e as atividades envolvem pesquisas, palestras com moradores da região e trabalhos práticos. ●



O QUE FAZER AGORA?

Walter A Boeger, PhD

Após esses dois anos de estudos, a equipe do GIA desvendou aspectos biológicos importantíssimos sobre a Doença do Caranguejo Letárgico. Esse, entretanto, é o momento de refletir sobre o que deve ser realizado para contemplar as comunidades de catadores ou marisqueiros que dependem do caranguejo-uçá como uma fonte importante de renda para suas famílias.

Nossos resultados indicam fortemente que a DCL não é consequência da introdução de novos agentes patogênicos, não é um caso de transmissão recente de patógenos entre espécies nativas e cultivadas, nem é diretamente relacionada com poluição ambiental. Ela é causada por uma espécie patogênica conhecida de ambientes aquáticos que muito provavelmente desenvolveu uma variedade altamente virulenta para o caranguejo-uçá. A doença, como sugerem as entrevistas com marisqueiros em Sergipe e Rio Grande do Norte, não é recente, tendo ocorrido previamente, há cerca

de 40-50 anos atrás. Na opinião de nossa equipe, os eventos de mortalidade nos manguezais de Sergipe tendem a se tornar cada vez menos frequentes (como comentado em capítulos anteriores) com a redução dos estoques e remoção de caranguejos mais susceptíveis das populações. Um equilíbrio entre agente patogênico e resistência dos caranguejos deve se estabelecer novamente por mais um longo período de tempo depois disso.

Após atingir esse equilíbrio, os estoques de caranguejo-uçá deverão se recuperar lentamente. A dinâmica de fluxo genético entre caranguejos dos diferentes estuários de Sergipe, resultado do projeto descrito nesta revista e financiado pelo SEBRAE-SE, demonstram que existe um grande intercâmbio de larvas entre as populações de caranguejos desses locais. Estes mecanismos de exportação e importação de larvas deverão ser responsáveis pelo repovoamento natural destes estoques de uçá a médio ou longo prazo. Todavia, o caranguejo-uçá demora entre 5-7 anos para atingir o tamanho comercial. Em regiões nas

quais as mortalidades ocorreram em apenas alguns manguezais, a re-colonização por caranguejos adultos oriundos de áreas não atingidas devem auxiliar esta recuperação.

Entretanto, a DCL ainda está presente e dispersando mais intensamente no sentido norte-sul, tendo recentemente atingido manguezais do sudeste brasileiro. Não existe nenhuma evidência que esta dispersão pare por aí. Portanto, casos da DCL deverão ocorrer em breve nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina. Apesar de tentativas de profissionais do meio ambiente em deter essa dispersão, especialmente no Espírito Santo (com o estabelecimento de barreiras sanitárias e controle de catadores externos no estado), a DCL foi introduzida nos manguezais desse estado recentemente, como vimos nos artigos anteriores.

A DCL trouxe enormes prejuízos ambientais e socioeconômicos que devem ser abordados pelas autoridades. Uma fórmula mágica, como alguns esperam, não existe. O controle de enfermidades

Medidas Proativas

Preparação da comunidade

Ofertar novas alternativas de renda

Organizar comunidades marisqueiras

Análise de risco da DCL

Desenvolver estratégias de conservação e manejo

Preservar

Plano de manejo

Redução pressão extrativismo



Medidas Reativas

Informar e conscientizar

Ofertar novas alternativas de renda

Organizar comunidades marisqueiras

Monitorar a DCL

Minimizar extração

Medidas de repovoamento de manguezais afetados

Preservar

Plano de manejo

Redução pressão extrativismo

Medidas proativas e reativas para mitigar os prejuízos ambientais e sócio-econômicos causados pelas mortandades provocadas pela Doença do Caranguejo Letárgico.

em ambientes naturais é impraticável e, como nos conta a história, a introdução de agentes biológicos ou químicos estranhos para buscar controlar enfermidades em populações animais nativas invariavelmente termina em desastres ecológicos de proporções muito maiores do que o problema inicial. A chegada da DCL em outros manguezais no país é inevitável.

Resta-nos, portanto, trabalhar com medidas preparatórias (proativas) e mitigatórias (reativas) para minimizar o impacto ambiental e socioeconômico da DCL. O usuário da espécie e do ambiente deve ser informado e conscientizado sobre os eventos dessas mortandades, a origem do agente patogênico e a dinâmica da enfermidade. Se ainda não o forem, as comunidades devem organizar-se com a orientação do governo ou outras instituições para que possam, junto com os tomadores de decisão, traçar objetivos para minimizar os impactos socioeconômicos e ambientais da DCL. Estudos emergenciais devem ser realizados com o objetivo de retirar a pressão de extração sobre as populações de uçá, visando a aceleração de sua recuperação natural. Análises de produção, tradições locais e potencialidades podem indicar as alternativas de renda para as comunidades marisqueiras que estão ou serão afetadas. Medidas concretas de preservação dos manguezais são fundamentais

se não já existirem.

Por fim, estudos emergenciais devem ser realizados para estabelecer a estratégia de recuperação dos estoques impactados de uçá. Dentre as diversas opções, os responsáveis envolvidos no gerenciamento do problema devem optar pela recuperação natural, repovoamento com indivíduos geneticamente resistentes produzidos em laboratório ou mesmo a translocação de adultos. Várias destas tecnologias já vêm sendo desenvolvidas pelo GIA, e podem ser implementadas em curto prazo. Estas decisões devem ser baseadas no monitoramento do agente patogênico, permitindo a avaliação do risco de mortandades e análises da dinâmica larval (fluxo gênico entre populações vizinhas) do caranguejo-uçá na região impactada ou sob risco.

É importante ressaltar que ainda há muito que se estudar sobre a DCL. Vários fatores importantes para entender a dinâmica desta doença são praticamente desconhecidos, como a forma de contágio desta doença, o nível de variação genética deste patógeno entre populações e a sua relação com fatores biológicos como a andada. Além disso, um estudo epidemiológico aprofundado usando ferramentas de modelagem matemática podem não só elucidar a dinâmica espacial e temporal da doença, como até mesmo fornecer expectativas sobre a sua

dinâmica futura.

Opções e soluções existem. Ignorar o problema pode resultar em problemas sociais e ambientais que perdurarão por um longo período, podendo mesmo ser irreversíveis em algumas regiões. ●



FINANCIANDO O FUTURO



O SEBRAE/SE financiou o projeto *"Estrutura genética dos estoques do caranguejo-uçá, *Ucides cordatus*, de Sergipe: Estuários dos Rios São Francisco, Japarutuba e Sergipe"*. Com essa iniciativa, o SEBRAE/SE deixa clara sua preocupação com a exploração mais sustentável dos recursos naturais e com todos aqueles setores da sociedade que dependem comercialmente da exploração do caranguejo. É o Sebrae/SE enxergando o mundo com outros olhos!

Projeto Caranguejo - O governo de Sergipe trabalhando para os marisqueiros voltarem a sorrir



adema