

# STRESS E IMMUNITÀ NEI GAMBERI ALLEVATI

**Mirella Vazzana, Nicolò Parrinello**

Dipartimento di Biologia Animale, Università di Palermo (Italia),  
Via Archirafi 18, 90123 Palermo - vazmir@unipa.it

## Introduzione

L'incremento della gambericoltura ha generato la necessità di conoscere meglio le cellule, le molecole e le vie del sistema immunitario al fine di prevenire o controllare le malattie trasmissibili negli stock di animali. Le esplosioni epidemiche causate principalmente da virus e batteri possono comportare perdite anche fino al 100% (Johnson, 1989; Lightner *et al.*, 1992; Lightner and Redman, 1998). Fino all'inizio degli anni novanta pochi studi hanno riguardato i gamberi, inoltre, le informazioni disponibili tendevano ad essere descrittive. L'impatto che le epidemie hanno avuto sulla produzione ha generato interesse verso il sistema immunitario dei gamberi. La prevenzione ed il trattamento di focolai di malattia sono stati prevalentemente realizzati con l'uso degli antibiotici. Tuttavia, oltre ai costi elevati, l'uso continuo di antibiotici si traduce in rischio ambientale, anche per la selezione di batteri resistenti presenti nell'ambiente e danno potenziale per la salute umana. Inoltre, non va sottovalutato l'effetto negativo sulla biodiversità. Recentemente è stato riportato (Dorts *et al.*, 2009) che l'endosulfan e il deltamethrin pesticidi comunemente usati in gambericoltura provocano stress ossidativi in *Penaeus monodon*, lo stesso è stato visto con l'enrofloxacin uno degli antibiotici più usati in gambericoltura (Tu *et al.*, 2008).

In molte situazioni di allevamento, sia l'ambiente sia l'ospite possono deviare dalle condizioni di omeostasi. Agenti stressanti come la selezione degli stock, la scarsa qualità dell'acqua, l'inquinamento, la nutrizione inadeguata, il sovraffollamento, l'ipossia, il trasporto, la manipolazione sono spesso determinanti per l'insorgenza della malattia.

## I fattori di stress modulano la funzione immunitaria

Nei vertebrati la risposta allo stress provoca una cascata di cambiamenti ormonali che porta alla produzione di cortisolo. Questi ormoni surrenali hanno diversi effetti, compresa la conversione del glicogeno a glucosio (risposta del tipo "combatti o fuggi"), ed il livello plasmatico di glucocorticoidi (GCs) è stato usato come indicatore dello stato di benessere degli animali (Bateson and Bradshaw, 1997; Jongman *et al.*, 2005). I GCs influenzano le cellule dell'immunità innata come i monociti/macrofagi, i neutrofilo e le cellule NK (Schmidt *et al.*, 1999), *down-regolano* i mediatori proinfiammatori secreti dai monociti (Joyce *et al.*, 1997; Breuninger *et al.*, 1993) ed inibiscono l'adesione, la chemiotassi, la fagocitosi e l'attività citotossica (McGillen and Phair, 1979; Roth and Kaeberle, 1981; McEwen *et al.*, 1997; Rogers *et al.*, 1999). Inoltre nei mammiferi l'esposizione *in vivo* or *in vitro* ai GCs, diminuisce la capacità battericida e fungicida (Rinehart *et al.*, 1975), la produzione di citochine, e l'attività tumoricida (Hogan and Vogel, 1988; Keil *et al.*, 1995) dei macrofagi. Nei pesci, il principale ormone glucocorticoido è il cortisolo ed esso modula le risposte immunitarie sia indirettamente (Vazzana *et al.*, 2002) sia direttamente attraverso un recettore citoplasmatico (Vizzini *et al.*, 2007; Vazzana *et al.*, 2010).

L'ormone iperglicemico dei crostacei (cHH) ha effetti sostanzialmente simili a quelli del cortisolo (Elwood *et al.*, 2009). L'effetto principale è di elevare i livelli di glucosio e lattato nell'emolinfa attraverso la mobilitazione della riserva intracellulare di glicogeno, ed il livello di cHH può essere usato come un indicatore di stress (Stentiford *et al.*, 2001).

Il neuropeptide cHH è sintetizzato nell'organo "X" e rilasciato dalla ghiandola del seno, entrambi localizzati nel peduncolo oculare. Accanto alle funzioni esercitate nel controllo del metabolismo e della riproduzione, il cHH è coinvolto nelle risposte a numerosi agenti stressanti ambientali, quali l'ipossia o i metalli pesanti (Chang *et al.*, 2006; Lorenzon, 2005). Condizioni ambientali sfavorevoli inducono un aumento della glicemia come effetto dell'aumento del livello di cHH emolinfatico. Tale livello segue un ritmo circadiano con un livello basale diurno che aumenta durante le ore notturne (Kallen *et al.*, 1990). La secrezione del cHH nell'emolinfa avviene in pochi minuti dopo un evento stressante (Chung e Webster, 2005).

La risposta immunitaria innata nei gamberi comprende meccanismi cellulari e umorali (Tincu e Taylor, 2004). Le risposte cellulari, di cui sono responsabili primari gli emociti, includono la fagocitosi, formazione di noduli, e l'incapsulazione, mentre le risposte umorali sono effettuate da tre meccanismi principali: cascata della profenolossidasi (proPO), coagulazione, e rilascio nella emolinfa di peptidi antimicrobici. L'attivazione della risposta umorale nei gamberi inizia con il riconoscimento di componenti della parete batterica da parte di proteine di riconoscimento che provocano il rilascio di peptidi antimicrobici e attivano la cascata proPO.

Qualsiasi tipo di variabile ambientale innalza da una parte il livello di cHH e dall'altra interferisce con il sistema immunitario sia cellulare sia umorale (Lorenzon, 2005). Il rilascio di cHH è regolato da altri mediatori come la serotonina, la dopamina ed anche gli emociti sembrano coinvolti in questa regolazione. Secondo Lorenzon (2005) queste cellule rilasciano mediatori in grado di regolare la concentrazione del cHH nell'emolinfa mentre mancano dati sull'azione diretta del cHH sugli immunociti paragonabile al meccanismo di azione del cortisolo sui leucociti nei pesci.

Nei gamberi i fattori ambientali più frequentemente saggiati sono la salinità, la temperatura, i composti azotati, la manipolazione, il pH e l'ipossia. Nella maggior parte degli studi l'immunità innata è stata valutata mediante la conta totale degli emociti, l'attività fenolossidasi e la fagocitosi, che di solito decrementano indipendentemente dalla tipologia del fattore stressante. Diversi studi condotti con agenti patogeni, come ad esempio WSSV o *V. alginolyticus* (Joseph e Philip, 2007; Hsu e Chen, 2007), mostrano che la mortalità è generalmente più elevata in animali stressati ed è riconducibile alla funzionalità del sistema immunitario.

### **Possiamo stimolare le difese immunitarie innate**

Gli invertebrati non producono linfociti e/o anticorpi specifici e, di conseguenza, non possiedono un sistema immunitario adattativo come i vertebrati. Il sistema di difesa degli invertebrati è basato sull'immunità innata che esclude la possibilità di vaccinazione. Tuttavia i fattori dell'immunità innata sono inducibili. Diversi lavori sono stati pubblicati in merito agli esperimenti per migliorare i meccanismi di difesa degli invertebrati (Schapiro *et al.*, 1974; Stewart e Zwicker, 1974; Itami and Takahashi, 1991; Sung *et al.*, 1991; Teunissen *et al.*, 1998; Alabi, 1999; Vici *et al.*, 2000). Nella maggior parte degli studi, come stimolante sono state utilizzate cellule uccise (*Vibrio*), glucani di lievito o elementi derivati o una combinazione di queste due componenti, che sono ampiamente applicati anche nell'allevamento di pesci (Sakai, 1999). Il potenziamento del sistema di difesa più fattibile nella gambericoltura è per via orale, e stimolanti sono stati spesso incorporati in *Artemia*.

Di recente è stata individuata la possibilità di usare anche i peptidi antimicrobici (PAM) come additivi al cibo per aumentare l'immunità dei gamberi. Infatti essi oltre che per la loro funzione antimicrobica possono agire come mediatori dell'infiammazione influenzando diversi processi come la proliferazione cellulare, la rimarginazione delle ferite, il rilascio di citochine e l'induzione immunitaria (Zaiou, 2007). Inoltre i geni che codificano questi PAM rappresentano buoni candidati per il miglioramento genetico finalizzato alla resistenza.

### **Peptidi e proteine antibatteriche**

I peptidi antimicrobici sono piccole molecole (spesso meno di 10 kDa o comprendenti meno di 100 aminoacidi) inducibili che uccidono i batteri e, talvolta, altri microrganismi. Sono spesso i prodotti di singoli geni e di cellule circolanti o che rivestono la superficie della mucosa. Sono stati identificati diverse centinaia di PAM e sono generalmente ritenuti come i primi effettori della difesa interna che agiscono da antibiotici naturali. La loro piccola dimensione li rende in grado di diffondere rapidamente nei siti di infezione, economici da sintetizzare e relativamente resistenti alla denaturazione. Queste caratteristiche li rendono interessanti per lo sfruttamento biotecnologico come biofarmaci nuovi. Nei crostacei il primo AMP ad essere riportato in letteratura è stato un peptide 6,5 kDa ricco di prolina presente negli emociti del granchio *Carcinus maenas* (Schnapp *et al.*, 1996). Da allora oltre 60 AMPs sono stati descritti nei gamberi. Essi comprendono una gamma di molecole e i tre gruppi principali sono le peneidine, le crustine ed i fattori antilipopolisaccaridi (ALFs). Le Peneidine sono espresse costitutivamente dagli emociti e sono caratterizzate da un dominio amino-terminale ricco di prolina- e uno carbossi-terminale ricco di cisteina. Il dominio carbossilico contiene 6 cisteine che formano una struttura a spirale con una  $\alpha$ -elica e due foglietti  $\beta$  (Yang *et al.*, 2003). Il dominio N-terminale dispone di una lunga 'coda' (Yang *et al.*, 2003) che aiuta il legame con i batteri (Bachère *et al.*, 2004). Le proteine sono sintetizzate con una breve sequenza segnale, che è composta da circa 19-21 aminoacidi. Il *cleavage* di questa regione rende le proteine mature (attive) e vengono liberate come un prodotto di secrezione dai granuli degli emociti (Muñoz *et al.*, 2002). Circa un terzo dei granuli sembrano esprimere le peneidine.

Le peneidine sono agenti molto potenti verso i microrganismi (Destoumieux *et al.*, 1997). Essi attaccano principalmente batteri Gram-positivi, ma possono anche uccidere i batteri Gram negativi e i funghi, secondo un meccanismo descritto da Shai (1999) e Huang (2000). Sono effettori chiave della difesa e sono espressi in tutte le fasi della vita (Chiou *et al.*, 2007). L'amidazione post-traduzionali del C-terminale sembra essere essenziale per l'attività antibatterica, ma non per l'attività antifungina (Bachère *et al.*, 2004). Invece le proprietà antifungine delle peneidine sembra essere dovuto alla capacità di queste di legare la chitina, probabilmente attraverso il dominio C-terminale (Destoumieux *et al.*, 2000). Sono state identificate e descritte 5 peneidine che differiscono nella sequenza e variano leggermente nella massa molecolare, ma tutti mantengono la stessa struttura di base, gli stessi domini e le stesse attività biologiche. All'interno di ciascuno di questi tipi ci sono varianti (isoforme) con un piccolo numero di sostituzioni di aminoacidi. È stato proposto un sistema unificato di classificazione e denominazione (Penbase) (Gueguen *et al.*, 2006; <http://www.penbase.immunaqua.com>). Nei crostacei sono state descritte anche le crustine. Sono peptidi cationici, in possesso di una sequenza segnale e un dominio ricco di cisteina all'estremità carbossi-terminale. Tuttavia, diversamente dalle peneidine, sono di circa 7-14 kDa e mancano di una coda ricca in prolina. Inoltre, le crustine sono attive principalmente contro i batteri Gram-positivi (Smith *et al.*, 2008) e sembrano anche avere proprietà inibitorie delle proteasi (Amparyup *et al.*, 2008). Hanno una moderata potenza antibatterica, almeno rispetto alle peneidine (Supungul *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2007a, b).

Le crustine oltre che nei gamberi, sono presenti anche in granchi e aragoste (Smith *et al.*, 2008). Il dominio C-terminale è tipicamente di otto residui di cisteina disposti in modo conservato a formare una spirale stretta. Questa disposizione dei residui di cisteina è anche conosciuta come un nucleo di quattro disolfuro (4DSC). In tutte le specie, le crustine sono espresse dagli emociti circolanti e sono generalmente espresse costitutivamente a livelli molto elevati (Smith *et al.*, 2008). Uno studio molto recente di Shockey *et al.*, (2009), ha dimostrato che il silenziamento dell'RNAi (RNA interference) del gene crustina di tipo II in *P. vannamei* determina una mortalità del 100% dei gamberi infettati con *Vibrio penaeicida*. Chiaramente le crustine contribuiscono in modo significativo alla difesa dell'ospite, ma poiché raramente uccidono direttamente i batteri Gram-negativi, è probabile che essi agiscano in altri modi, magari come inibitori di serin-proteasi.

Il fattore antilipopopolisaccaride (ALF) è un piccola proteina originariamente isolata da emociti del granchio, *L. polyphemus* (LALF) e di *Tachypleus tridentatus* (TALF) (Tanaka *et al.*, 1982.; Aketagawa *et al.*, 1986). LALF si lega e neutralizza LPS ed esibisce un effetto antibatterico sulla crescita del batterio gram-negativo *Salmonella minnesota* ma non sul Gram-positivo *S. aureus* (Morita *et al.*, 1985). Dopo questa scoperta varie proteine leganti i lipopolisaccaridi hanno suscitato grande interesse come agenti terapeutici candidati per la gestione degli shock settici (Vallespi *et al.*, 2000).

## I peptidi antimicrobici: una nuova frontiera per il controllo delle infezioni microbiche

I peptidi antimicrobici potrebbero rappresentare una buona alternativa terapeutica per il trattamento delle malattie in acquacoltura. Sono molecole naturali con un ampio spettro di attività contro una vasta gamma di microrganismi, sono facili da produrre, e sono meno inclini a indurre resistenza. Alcuni peptidi antimicrobici sono già in uso clinico e commerciale (Reddy *et al.*, 2004), ma il loro ruolo per il controllo delle malattie nel settore dell'acquacoltura deve ancora essere dimostrato anche perché mancano linee cellulari di gamberi. Un'indicazione proviene dall'ALF che può interferire con la replicazione del virus responsabile della *white spot syndrome* (Liu *et al.*, 2006). Inoltre si è visto che AMPs di gamberi, LitvanPen3 e ALFPm3, hanno attività antivirale contro l'*herpes simplex* di tipo 1, l'adenovirus umano respiratorio ed il rotavirus SA11 (Carriel-al Gomes *et al.*, 2007).

Oltre alla loro diretta funzione antimicrobica, gli AMPs svolgono anche il ruolo di mediatori dell'infiammazione influenzando processi diversi, come la proliferazione cellulare, la guarigione delle ferite, il rilascio di citochine ed induzione immunitaria (Zaiou, 2007). L'applicazione di AMPs come additivo alimentare per aumentare l'immunità del gambero è una strategia alternativa per combattere le infezioni microbiche. Evidentemente, i geni che codificano questi amplificatori rappresentano buoni candidati per il miglioramento genetico di gamberi, per la resistenza allo stress ed a gravi agenti patogeni.

## Conclusioni

I crostacei sono sotto l'influenza di numerosi fattori ambientali. In primo luogo, i cambiamenti dell'ambiente naturale secondo ritmi giornalieri o stagionali che gli organismi subiscono. Lo stress ambientale da inquinanti sembra essere un fattore determinante per la comparsa della malattia. I crostacei ed i gamberi allevati in

particolare sono soggetti a variazioni climatiche e stress causato da pratiche di allevamento che incidono sulla qualità fisico-chimica delle acque influenzando il metabolismo, la crescita, la muta, la sopravvivenza ed il sistema immunitario. Finora, ci sono pochi studi che collegano l'immuno-resistenza alla sensibilità dell'organismo ad agenti patogeni, soprattutto a causa della mancanza di modelli sperimentali di infezione.

In tale contesto, particolare rilievo assume la sperimentazione sui peptidi antimicrobici e la loro modulazione. L'attività ad ampio spettro di queste molecole e la loro indicibilità aprono prospettive di grande interesse per interventi innovativi in gambericoltura.

## Referenze

- Aketagawa J., Miyata T., Ohtsubo S., Nakamura T., Morita T., Hayashida H., Miyata T., Iwanaga S., Takao T. & Shimonishi Y., 1986. Primary structure of limulus anticoagulant anti-lipopolysaccharide factor. *Journal of Biological Chemistry*, 261: 7357-7365.
- Alabi A.O., Jones D.A. & Latchford J.W., 1999. The efficacy of immersion as opposed to oral vaccination of *Penaeus indicus* larvae against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 178: 1-11.
- Amparyup P., Kondo H., Hirono I., Aoki T. & Tassanakajon A., 2008. Molecular cloning, genomic organization and recombinant expression of a crustin-like antimicrobial peptide from black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Molecular Immunology*, 45: 1085-1093.
- Bachère E., Gueguen Y., Gonzalez M., de Lorgeril J., Garnier J. & Romestand B., 2004. Insights into the antimicrobial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. *Immunology Reviews*, 198: 149-168.
- Bateson P. & Bradshaw E.L., 1997. Physiological effects of hunting red deer (*Cervus elaphus*), *Proceedings of the Royal Society B*, 264: 1707-1714.
- Breuninger L.M., Dempsey W.L., Uhl J. & Murasko D.M., 1993. Hydrocortisone regulation of interleukin-6 protein production by a purified population of human peripheral blood monocytes, *Clinical Immunology and Immunopathology*, 69: 205-214.
- Carriel-Gomes M.C., Kratz J.M., Barracco M.A., Bachere E., Barardi C.R. & Simoes C.M., 2007. *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus 1, adenovirus, and rotavirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102: 469-472.
- Chang C.C., Lee P.P., Liu C.H. & Cheng W., 2006. Trichlorfon, an organophosphorus insecticide, depresses the immune responses and resistance to *Lactococcus garvieae* of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 574-585.
- Chiou T.T., Lu J.K., Wu J.L., Chen T.T., Ko C.F. & Chen J.C., 2007. Expression and characterisation of tiger shrimp *Penaeus monodon* penaeidin (mo-penaeidin) in various tissues, during early embryonic development and moulting stages. *Developmental and Comparative Immunology*, 31: 132-142.
- Chung J.S. & Webster S.G., 2005. Dynamics of *in vivo* release of molt-inhibiting hormone and crustacean hyperglycemic hormone in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Endocrinology*, 146: 5545-5551.
- Destoumieux D., Bulet P., Loew D., VanDorselaer A., Rodriguez J. & Bachere E., 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272: 28398-28406.
- Destoumieux D., Munoz M., Cosseau C., Rodriguez J., Bulet P., Comps M. & Bachere E., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge. *Journal of Cell Science*, 113: 461-469.
- Dorts J., Silvestre F., Thi Tua H., Tyberghein A.E., Thanh Phuong N. & Kestemont P., 2009. Oxidative stress, protein carbonylation and heat shock proteins in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, following exposure to endosulfan and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28: 302-310.
- Elwood R.W., Barr S. & Patterson L., 2009. Pain and stress in crustaceans? *Applied Animal Behaviour Science*, 118: 128-136.

- Gueguen Y., Garnier J., Robert L., Lefranc M.P., Mougnot I., De Lorgeril J., Janech M., Gross P.S., Warr G.W., Cuthbertson B., Barracco M.A., Bulet P., Aumelas A., Yang Y.S., Bo D., Xiang J.h., Tassanakajon A., Piquemal D. & Bachère E., 2006. Penbase, the shrimp antimicrobial peptide penaeidin database: Sequence-based classification and recommended nomenclature. *Developmental and Comparative Immunology*, 30: 283-288.
- Hogan M., & Vogel S.N., 1988. Production of tumor necrosis factor by rIFN-gamma-primed C3H/HeJ (Lpsd) macrophages requires the presence of lipid A-associated proteins. *Journal of Immunology*, 141: 4196-4202.
- Hsu S.W. & Chen J.C., 2007. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress. *Aquaculture*, 271: 61-69.
- Huang H.W., 2000. Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, 39: 8347-8352.
- Itami T. & Takahashi Y., 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. *Journal of Aquatic Animal Health*, 3: 151-152.
- Johnson S.K., 1989. Handbook of Shrimp Diseases. Sea Grant, Texas A & M University, 27 pp.
- Jongman E.C., Bidstrup I. & Hemsworth P.H., 2005. Behavioural and physiological measures of welfare of pregnant mare fitted with a novel urine collection device. *Applied of Animal. Behaviour Science*, 93: 147-163.
- Joseph A. & Philip R., 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection *Aquaculture*, 272: 87-97.
- Joyce D.A., Steer J.H. & Abraham L.J., 1997. Glucocorticoid modulation of human monocyte/macrophage function: control of TNF- $\alpha$  secretion. *Inflammation Research*, 46: 447-451.
- Kallen J.L., Abrahamse S.L. & Van Herp F., 1990. Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. *The Biological Bulletin*, 179: 351-357.
- Keil D.E., Luebke R.W. & Pruett S.B., 1995. Differences in the effects of dexamethasone on macrophage nitrite production: dependence on exposure regimen (*in vivo* or *in vitro*) and activation stimuli, *International Journal of Immunopharmacology*, 17: 157-166.
- Lightner D.V. & Redman R.M., 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164: 201-220.
- Lightner D.V., Bell T.A., Redman R.M., Mohny L.L., Natividad J.M., Rukyani A. & Poernomo A., 1992. A review of some major diseases of economic significance in penaeid prawns/shrimps of the Americas and Indopacific. In: Shariff M., Subasinghe R. P. and Arthur J. R. (editors). Diseases in Asian Aquaculture I. Fish Health section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 57-80.
- Liu H., Jiravanichpaisal P., Söderhäll I., Cerenius L. & Söderhäll K., 2006. Anti-lipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication *in vitro* and *in vivo* in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Virology*, 80: 10365-10371.
- Lorenzon S., 2005. Hyperglycemic stress response in Crustacea. *Invertebrate Survival Journal*, 2: 132-141.
- McEwen C.D., Conrad Y., Kuroda M., Frankfurt A.M., Magarinos & McKittrick C., 1997. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. *European Neuropsychopharmacology*, 7: S323-S328 Review.
- McGillen & J. Phair, 1979. Polymorphonuclear leukocyte adherence to nylon: effect of oral corticosteroids, *Infection and Immunity*, 26: 542-546.
- Morita T., Ohtsubo S., Nakamura T., Tanaka S., Iwanaga S., Ohashi K., & Niwa M., 1985. Isolation and biological activities of limulus anticoagulant (anti-LPS factor) which interacts with lipopolysaccharide (LPS). *Journal of Biochemistry* (Tokyo), 97: 1611-1620.
- Munõz M., Vandenbulcke F., Saulnier D. & Bachère E., 2002. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimps. *European Journal of Biochemistry*, 269: 2678-2689.
- Reddy K.V.R., Yedery R.D. & Aranha C., 2004. Antimicrobial peptides: Premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24: 536-547.



- Rinehart J.J., Sagone A.L., Balcerzak S.P., Ackerman G.A. & LoBuglio A.F., 1975. Effects of corticosteroid therapy on human monocyte function. *The New England Journal of Medicine* 292: 236-241.
- Rogers I.T., Holder D.J., McPherson H.E., Acker W.R., Brown E.G., Washington M.V., Motzel S.L. & Klein H.J., 1999. Influence of blood collection sites on plasma glucose and insulin concentration in conscious C57BL/6 mice. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 38: 25-28.
- Roth J.A. & Kaeberle M.L., 1981. Effects of *in vivo* dexamethasone administration on *in vitro* bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity*, 33: 434-441.
- Sakai M., 1999. Current status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.
- Schapiro H.C., Mathewson J.H., Steenbergen J.F., Kellogg S., Ingram C., Nierengarten G. & Rabin H., 1974. Gaffkemia in the Californian spiny lobster, *Panulirus interruptus*: infection and immunization. *Aquaculture*, 3: 403-408.
- Schmidt M., Pauels H.G., Lugerling N., Lugerling A., Domschke W. & Kucharzik T., 1999. Glucocorticoids induce apoptosis in human monocytes: potential role of IL-1 $\beta$ . *Journal of Immunology*, 163: 3484-3490.
- Schnapp D., Kemp G.D. & Smith V.J., 1996. Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin 7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 240: 532-539.
- Shai Y., 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochimica Biophysica Acta*, 1462: 55-70.
- Shockey J.E., O'Leary N.A., de la Vega E., Browdy C.L., Baatz J.E. & Gross P.S., 2009. The role of crustins in *Litopenaeus vannamei* in response to infection with shrimp pathogens: an *in vivo* approach. *Developmental Comparative Immunology*, 33: 668-673.
- Smith V.J., Fernandes J.M.O., Kemp G.D. & Hauton C., 2008. Crustins: enigmatic WaP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 758-772.
- Stentiford G.D., Chang E.S., Chang S.A. & Neil D.M., 2001. Carbohydrate Dynamics and the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH): Effects of Parasitic Infection in Norway Lobsters (*Nephrops norvegicus*). *General and Comparative Endocrinology*, 121: 13-22.
- Stewart J.E. & Zwicker B.M., 1974. Comparison of various vaccines for inducing resistance in the lobster, *Homarus americanus* to the bacterial infection, Gaffkemia. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31: 1887-1892.
- Sung H.H., Song Y.L. & Kou G.H., 1991. Potential use of bacterin to prevent shrimp vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 1: 311-312.
- Supungul P., Tang S., Maneeruttanarungroj C., Rimphanitchayakit V., Hirano I., Aoki T. & Tassanakajon A., 2008. Cloning, expression and antimicrobial activity of crustinPm1, a major isoform of crustin, from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 61-70.
- Tanaka S., Nakamura T., Morita T. & Iwanaga S., 1982. Limulus anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of limulus coagulation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 105: 717-723.
- Teunissen O.S.P., Faber R., Booms G.H.R., Latscha T. & Boon J.H., 1998. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius). *Aquaculture*, 164: 359-366.
- Tincu J.A. & Taylor S.W., 2004. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates Antimicrobial agent and Chemotherap, p. 3645-3654.
- Tu H.T., Silvestre F., Bernard A., Douny C., Phuong N.T., Tao C.T., Maghuin-Rogister G. & Kestemont P., 2008. Oxidative stress response of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to enrofloxacin and to culture system. *Aquaculture*, 285: 244-248.

- Vallespi M.G., Glaria L.A., Reyes O., Garay H.E., Ferrero J. & Arana M.J., 2000. A Limulus antilipopopolysaccharide factor derived peptide exhibits a new immunological activity with potential applicability in infectious diseases. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7: 669-675.
- Vazzana M., Cammarata M. & Parrinello N., 2002. Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture*, 210: 231-243.
- Vazzana M., Vizzini A., Sanfratello M. A., Celi M., Salerno G. & Parrinello N., 2010. Differential expression of two glucocorticoid receptors in seabass (teleost fish) head kidney after exogenous cortisol inoculation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 157: 49-54.
- Vici V., Bright Sing I.S. & Bhat S.G., 2000. Application of bacterins and yeast *Acremonium dyosporii* to protect the larvae of *Macrobrachium rosenbergii* from vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, 10: 559-563.
- Vizzini A., Vazzana M., Cammarata M. & Parrinello N., 2007. Peritoneal cavity phagocytes from the teleost sea bass express a glucocorticoid receptor (cloned and sequenced) involved in genomic modulation of the *in vitro* chemiluminescence response to zymosan. *General Comparative Endocrinology*, 150: 114-123.
- Yang Y., Poncet J., Garnier J., Zatylny C., Bachère E. & Aumelas A., 2003. Solution structure of the recombinant penaeidin-3, a shrimp antimicrobial peptide. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 36853-36867.
- Zaiou M., 2007. Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *Journal of Molecular Medicine*, 85: 317-329.
- Zhang J.Q., Li F.H., Wang Z.Z. & Xiang J.H., 2007a. Cloning and recombinant expression of a crustin-like gene from Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Journal of Biotechnology*, 127: 605-614.
- Zhang J.Q., Li F.h., Wang Z.Z. & Xiang J.H., 2007b. Expression, purification, and characterization of recombinant Chinese shrimp crustin-like protein (CruFc) in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters*, 29: 813-817.