



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Juliana do Nascimento Ferreira

Avaliação do estado imunológico de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistemas de bioflocos heterotrófico e quimioautotrófico

Florianópolis
2022

Juliana do Nascimento Ferreira

Avaliação do estado imunológico de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistemas de bioflocos heterotrófico e quimioautotrófico

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Aquicultura.

Orientador(a): Prof.(a) Luciane Maria Perazzolo, Dr.(a)

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira , Juliana do Nascimento

Avaliação do estado imunológico de camarões *Litopenaus vannamei* cultivados em sistemas de bioflocos heterotrófico e quimioautotrófico / Juliana do Nascimento Ferreira ; orientador, Luciane Maria Perazzolo, 2022.

79 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. BFT. 3. imunidade intestinal. 4. imunoparâmetros. 5. crustáceos. I. Perazzolo, Luciane Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

Juliana do Nascimento Ferreira

Avaliação do estado imunológico de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em sistemas de bioflocos heterotrófico e quimioautotrófico

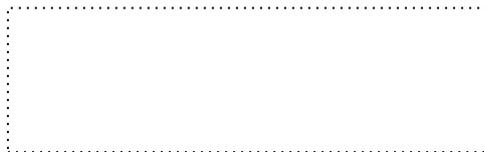
O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado, em 27 de outubro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Luciane Maria Perazzolo, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Walter Quadros Seiffert, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Gabriel Machado Matos, Dr.
Instituto Karolinska

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestra em aquicultura.



Coordenação do Programa de Pós-Graduação



Prof.(a) Luciane Maria Perazzolo, Dr.(a)
Orientadora

Florianópolis, 2022

Dedico este trabalho à minha querida família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, por nunca me deixar só e me guiar sempre em todos os momentos, meu coração exalta de gratidão e alegria, jamais seria possível sem a tua ajuda.

Aos meus pais, Jocélia do Nascimento Ribeiro Ferreira e José Vandemberg Ribeiro Ferreira, essa vitória é nossa! Vocês são os meus maiores exemplos de força, determinação, coragem e de sucesso. Ao meu esposo, amigo e companheiro Igor Bartolomeu Alves de Barros, pelo companheirismo, amor, carinho, cuidado e por sempre acreditar e me apoiar. Obrigada por estar comigo nessa jornada! Também agradeço, ao meu irmão Augusto e “sobrinha” Mel. Vocês são luz em minha vida. Obrigada por todo carinho, amor, apoio, compreensão e palavras de incentivo. Sem vocês jamais seria possível chegar aqui!

Agradeço a minha orientadora e amiga Dra. Luciane Maria Perazzolo, por todos os ensinamentos durante esses anos e pela confiança a mim depositada. Obrigada por me apresentar o mundo da imunologia dos crustáceos, serei eternamente grata a todos os ensinamentos. Agradeço pelas palavras de motivação, pois me ajudaram muito nos momentos de angústias. Obrigada por compreender as minhas falhas e sempre me ajudar a ser uma profissional melhor! Agradeço muito por sua amizade Lú, pelas conversas informais e pelo carinho de sempre!

Agradeço ao professor Dr. Rafael Diego da Rosa por me receber muito bem no laboratório, por me apresentar ao mundo encantador da biologia molecular e demais ensinamentos compartilhados durante esses anos, sem eles a trajetória teria sido muito mais difícil. Rafa, obrigada pela amizade, pelas conversas informais e pelo carinho de sempre!

Agradeço a todos os profissionais e educadores incríveis que tive a grande oportunidade de conviver durante esses 8 anos de formação. Agradeço ao Vitor Pré- Vestibular, em especial ao professor Vitor Quintan por me mostrar que a educação é transformadora e que todos podem chegar onde quisermos se tivermos dedicação! Agradeço aos educadores, profissionais e amigos que convivi em Manaus, por meio da Universidade Federal do Amazonas, onde tive a honra de me formar como Engenheira de Pesca. Em especial, agradeço aos meus antigos orientadores Thaís Billalba, Bruno Cavero, Antônio Inhamuns e Marle Angélica, por contribuírem inicialmente na minha formação científica, sou eternamente grata.

Agradeço também aos profissionais e educadores da Universidade Federal de Santa Catarina, por todo conhecimento passado. Agradeço o empenho do PPG Aquicultura da UFSC durante a pandemia, em especial ao senhor Carlito e a professora Leila, por todo amparo fornecido aos alunos durante esse triste momento.

Agradeço aos antigos amigos e colegas de laboratório do LIAA, pela recepção calorosa, pelos momentos na copa e por todo conhecimento compartilhado durante esse período. Obrigada, Talita, Gabriel, Flávio, Leandra, Breno, Nicolas, Gustavo, Natan, Thais, Cairé e Mariana. Aos atuais amigos e colegas de laboratório, agradeço pela chegada de vocês, vocês deram vida ao ambiente! Agradeço pela parceria no final dos experimentos, pelas conversas informais no corredor e pelos bons momentos vividos fora e dentro do laboratório. Obrigada Beatriz G., José, Beatriz L., Vanessa, Gustavo, Abdon e Camila. Tenho muito orgulho de ter trabalhado com profissionais altamente capacitados, proativos, responsáveis e comprometidos com a ciência. Admiro muito vocês!

Deixo em especial alguns agradecimentos para Talita G., Beatriz G., Gabriel, Walewska, Denner, Mainara e ao José. A mestra Talita, amiga e parceira desse projeto, uma pessoa rara de se encontrar nessa vida, sempre disposta em ajudar, aconselhar e ser luz em momentos de escuridão. A minha querida amiga Bea (Beatriz G.), agradeço por toda ajuda fornecida tanto em assuntos de trabalho como em assuntos pessoais. Você é uma pessoa e profissional incrível, super talentosa que tenho muito orgulho de ter trabalho e tido a oportunidade de amadurecer uma linda amizade. Ao querido Gabi (Gabriel), obrigada por todos os ensinamentos, pelos bons momentos dentro e fora do laboratório, e por manter nossa “conexão de milhões”, só tenho a agradecer pelos bons momentos contigo. Aos queridos “pais” do Floriano, Walewska e Denner muito obrigada serem a extensão da minha família e meu porto seguro em Florianópolis, sou eternamente grata por tudo que vocês fizeram por mim e pela bela amizade construída. Agradeço a Maimai (Mainara) e Breno, pelo carinho espontâneo de sempre. Ao “conterrâneo” e amigo Zé (José), agradeço por compartilhar um pouco do seu jeito leve e divertido de levar a vida e por toda ajuda fornecida ao final dos experimentos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço também a todas as pessoas que sempre estão torcendo para o meu sucesso!

RESUMO

O uso de medidas profiláticas visando a contenção de doenças nos cultivos e a busca por ferramentas biotecnológicas que aumentem a resistência e a imunocompetência dos peneídeos são fundamentais para a sustentabilidade da carcinicultura. O presente estudo investigou o efeito de dois diferentes sistemas de cultivos em bioflocos, heterotrófico (BFT.H) e quimioautotrófico (BFT.Q), sobre o estado imunológico geral de camarões *Litopenaeus vannamei*, por meio de análises bioquímicas (parâmetros hemato-imunológicos) e moleculares (expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio). Animais cultivados em BFT.Q apresentaram melhores condições gerais de imunocompetência que os em BFT.H, possivelmente associado às suas condições ambientais mais estáveis. Independentemente do sistema BFT, camarões cultivados em bioflocos apresentaram maior capacidade aglutinante na hemolinfa, sugerindo maior capacidade de reconhecer e imobilizar potenciais microrganismos patogênicos. Enquanto camarões em BFT.Q apresentaram expressão diferencial de genes associados às defesas antivirais (*LvDICER1*, sistema RNAi) e antimicrobianas (*LvPPAE-2* sistema proPO; *Litovan STY1* peptídeo antimicrobiano com atividade antifúngica - stylicina), o cultivo em BFT.H promoveu aumento no perfil transcricional voltado para defesas contra bactérias e fungos (*Litovan ALF-A*). Ademais, o perfil transcricional de 16S rRNA de algumas das principais comunidades bacterianas de peneídeos revelou maior abundância e viabilidade dos filos Actinobacteria e Firmicutes no intestino médio de camarões criados em BFT.Q e BFT.H, respectivamente. Curiosamente, o aumento de Firmicutes esteve associado a picos de compostos nitrogenados no BFT.H. Em conjunto, estes achados fornecem novas evidências sobre o impacto de diferentes sistemas de BFT sobre a imunocompetência e as comunidades bacterianas do intestino médio dos camarões. Por fim, esses *insights* podem auxiliar na compreensão da interação ambiente, imunidade do camarão e microbiota, visando a prevenção de doenças na carcinicultura.

Palavras-chave: Aquicultura; BFT; imunoparâmetros; imunidade intestinal; crustáceos.

ABSTRACT

Prophylactic measures to prevent diseases in shrimp farms and promote immunocompetence in animals are essential to ensure the sustainability of aquaculture. Herein, we investigated the immunological status of *Litopenaeus vannamei* juveniles cultured in two biofloc systems: heterotrophic (BFT.H) and chemoautotrophic (BFT.Q) by analyzing some hemato-immunological parameters and the transcriptional levels of immune-related genes in the midgut. The BFT-chemoautotrophic system presented more stable chemical conditions than the BFT.H, which was reflected in superior immunocompetence in animals. Generally, shrimp cultured in bioflocs had a higher agglutinating capacity than animals reared in clean water, indicating a better ability to recognize and immobilize potentially pathogenic microorganisms through hemolymph. Among all 53 genes analyzed in the midgut, *Litvan*STY1 (antimicrobial peptide; antifungal activity), *Lv*Dicer1 (endoribonuclease from the RNAi antiviral system), and *Lv*PPAE-2 (prophenoloxidase-activating enzyme) showed higher transcriptional levels in shrimp reared in BFT.Q. By contrast, only *Litvan*ALF-A (antimicrobial peptide; responses against bacteria and fungi) had a differential expression in animals reared in BFT.H. In addition, 16S rRNA transcriptional profiling of some main bacterial phyla present in shrimp revealed greater abundance and viability of Actinobacteria and Firmicutes in shrimp midgut reared in BFT.Q and BFT.H, respectively. Interestingly, the increment of Phylum Firmicutes in the midgut of shrimp reared in BFT.H was associated with peaks of nitrogenous compounds in this biofloc system. Taken together, our findings provide new evidence of the impact that different BFT systems can have on shrimp immunocompetence and/or on bacterial communities colonizing the midgut. Finally, these insights can shed light on the interaction between the environment, shrimp immunity, and microbiota, aiming at disease prevention in shrimp farming.

Keywords: Aquaculture; BFT; immunoparameters; intestinal immunity; crustaceans.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar adulto do camarão <i>Litopenaeus vannamei</i>	18
Figura 2. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos de camarões mediante ligação entre as proteínas de reconhecimento-padrão presente na superfície dos hemócitos com aos padrões moleculares associados a patógenos, na superfície dos microrganismos.	22
Figura 3. Esquema representativo (fora de escala) do trato gastrointestinal, órgãos associados e sistema circulatório de camarões peneídeos.	23
Figura 4. Esquema (fora de escala) da remoção dos compostos nitrogenados no sistema de bioflocos.	26
Figura 5. Principais padrões moleculares associados a microrganismos (PMAPs) (fora de escala) presentes nos sistemas de cultivo em bioflocos.	28
Figura 6. Algumas respostas do hospedeiro associadas à potencial função probiótica atribuídas a componentes dos sistemas de bioflocos.	29
Figura 7. Detalhes do desenho experimental.	37
Figura 8. Variação dos níveis de amônia total e nitrito ao longo de um cultivo de juvenis <i>Litopenaeus vannamei</i> em dois sistemas de bioflocos.	43
Figura 9. Avaliação de diferentes parâmetros hemato-imunológicos em juvenis de <i>Litopenaeus vannamei</i> após o cultivo em sistemas de bioflocos quimioautotrófico e heterotrófico.	45
Figura 10. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações.	46
Figura 11. Análise global da expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i>	48
Figura 12. Genes diferencialmente expressos no intestino médio de camarões <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados em diferentes sistemas de bioflocos.	50
Figura 13. Quantificação absoluta dos transcritos bacterianos no intestino médio de camarões cultivados em AC (água clara), BFT.Q (quimioautotrófico) e BFT. H (heterotrófico).	52
Figura 14. Visão geral da abundância relativa percentual do nível de transcritos 16SrRNA específicos para alguns grupos bacterianos ocorrendo no intestino médio de <i>Litopenaeus vannamei</i> cultivados em diferentes sistemas	53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão	78
Quadro 2. Pares de base das sequências inseridas nos plasmídeos (insertos) e do vetor correspondente para cada grupo bacteriano analisado.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis de parâmetros de qualidade da água nos sistemas quimioautotrófico e heterotrófico no cultivo de <i>L. vannamei</i> em bioflocos.	44
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Água clara ou Controle
AHPND	<i>Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease</i>
AOB	<i>ammonia-oxidizing bactéria</i>
BFT	<i>Biofloc Technology System</i>
BFT.H	Sistema de Bioflocos Heterotrófico
BFT.Q	Sistemas de Bioflocos Quimioautotrófico
CA	Capacidade aglutinante da hemolinfa
CA	Ceco anterior
cDNA	DNA complementar
CP	Concentração de proteínas totais
Cq	Ciclo de quantificação
CTH	Contagem totais de hemócitos
DIV 1	<i>Decapod Iridescent Virus 1</i>
EST	Estômago
ETOs _e	Armadilhas Extracelulares de Ácidos Nucleicos
F.I.	Fator de Impacto
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura
HP	Hepatopâncreas
IHHNV	<i>Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus</i>
IM	Intestino Médio
IM	Intestino médio
IMNV	<i>Infectious Myonecrosis Virus</i>
IMTA	<i>Integrated Multi-thopic Aquaculture</i>
IP	Intestino posterior
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácidos lipotecoicos
MAMPs	Padrões Moleculares Associados a Microrganismos
NOB	<i>nitrite-oxidizing bacteria</i>
PAM	Peptídeos Antimicrobianos
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PGN	Peptidoglicanas
PO	fenoloxidase

proPO	pró-fenoloxidase
PRP	Proteínas de Reconhecimento Padrão
RAS	<i>Recirculating Aquaculture System</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNI	Espécies reativas de nitrogênio
ROI	Espécies reativas de oxigênio
rRNA	RNA ribossomal
SST	Sólidos totais em suspensão
TSV	<i>Taura Syndrome Virus</i>
WSSV	<i>White Spot Syndrome Virus</i>
YHV	<i>Yellow Head Virus</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
\leq	Maior ou igual
\geq	Menor ou igual
%	Porcentagem
Δ	Letra grega delta
μ	Micro
\pm	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1	OBJETIVOS	31
1.1.1	Objetivo geral.....	31
1.1.2	Objetivos específicos.....	31
2	ARTIGO CIENTÍFICO	32
2.1	INTRODUÇÃO.....	34
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	36
2.2.1	Animais e delineamento experimental.....	36
2.2.2	Coleta da hemolinfa e preparação do soro	37
2.2.3	Atividade da fenoloxidase (PO) e concentração de proteínas totais (CP)	38
2.2.4	Capacidade aglutinante da hemolinfa	38
2.2.5	Contagem total de hemócitos (CTH)	39
2.2.6	Coleta e processamento dos intestinos médios (IM).....	39
2.2.7	Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	39
2.2.8	Transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	40
2.2.9	Quantificação absoluta de transcritos bacterianos por RT-qPCR.....	41
2.2.10	Análise estatística.....	41
2.3	RESULTADOS	42
2.3.1	O perfil da qualidade da água demonstrou diferenças entre os sistemas de bioflocos	42
2.3.2	Algumas respostas imunológicas dos camarões foram alteradas em função do tipo de sistema de cultivo em bioflocos	44
2.3.3	Alguns genes do sistema imune apresentaram expressão diferencial associada ao tipo de sistema de cultivo em bioflocos	46
2.3.4	A abundância dos transcritos do gene 16S rRNA variou entre as comunidades bacterianas endobiontes em função do sistema de cultivo em bioflocos.....	50
2.4	DISCUSSÃO.....	54
2.5	CONCLUSÃO.....	64
2.6	REFERÊNCIAS	66
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	73
	ANEXOS.....	78

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com o aumento crescente da população mundial, a demanda por alimentos proteicos de alta qualidade é uma necessidade importante, parte dela sendo sanada pela atividade aquícola, visto que a pesca extrativista está estagnada desde a década de 80 (ANDERSON; ASCHE; GARLOCK, 2018; FAO, 2020). De maneira preocupante, os últimos dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO) demonstram que houve um declínio de 6,8% na produção pesqueira marinha mundial de 2018 a 2020 (FAO, 2022), agravando ainda mais esse cenário. Nesse sentido, muitos esforços devem ser realizados para o desenvolvimento de inovações tecnológicas e para se ter incentivos políticos que estabeleçam uma relação mais equilibrada entre o crescimento populacional, a preservação do meio ambiente e a produção de alimentos (ANDERSON; ASCHE; GARLOCK, 2018; FAO, 2020).

Mundialmente, 17% do alimento disponível contendo proteína animal provém de alimentos aquáticos, sendo 7% de todas as proteínas (FAO, 2022). Em 2020, o setor aquícola contribuiu com 47% na produção mundial de peixes (piscicultura), 28,6% na produção de algas (algacultura), 14,5% na produção de moluscos (malacocultura), 9,2% na produção de crustáceos decápodes, especialmente os camarões marinhos (carcinicultura) e 0,9% na produção de outros organismos aquáticos (FAO, 2022). A carcinicultura representa um dos setores do agronegócio internacional que mais crescem, compondo a pauta de exportação de muitos países, como Tailândia, Indonésia, Vietnã e China, na Ásia e Equador, México e Brasil nas Américas. A produção mundial de peneídeos em 2020 atingiu o recorde de 11,2 milhões de toneladas, movimentando um valor de mercado de 81,5 bilhões de dólares (FAO, 2022). Países do Leste e Sudeste Asiático e América Latina respondem pela maior parte da produção mundial, sendo que o Brasil ocupa a décima posição mundial, atingindo em 2020 uma produtividade de 112 mil toneladas. A região Nordeste, representada especialmente pelos estados do Ceará e Rio Grande do Norte, é responsável por 68% da produção nacional de camarões marinhos (CNA, 2021; FAO, 2022).

As duas espécies de peneídeos mais cultivadas no mundo são o camarão-branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei* (83,1% da produção mundial) e o camarão-tigre-gigante, *Penaeus monodon* (11,8%), originário das águas costeiras da região Indo-Pacífica (JUNNING CAI *et al*, 2021). O destaque na produção do *L. vannamei* (**Figura 1**) nos cultivos em diversas regiões do mundo são atribuídos às suas excelentes características zootécnicas, como boa taxa de conversão alimentar, bom crescimento e fecundidade, tolerância à altas densidades de

estocagem, a salinidades extremas, a baixas temperaturas e resistentes ao manejo em cativeiro (MATTHEW BRIGGS, SIMON FUNGE-SMITH, 2004).

Figura 1. Exemplar adulto do camarão *Litopenaeus vannamei*.



Considerações sobre as enfermidades na carcinicultura

Nos sistemas de produção animal, incluindo a carcinicultura, o lucro financeiro é o objetivo final. Contudo, nem sempre as práticas de manejo adotadas são adequadas e respeitam a fisiologia dos animais para resultar em saúde e crescimento almejados. Esse é um fator extremamente relevante e que deve ser considerado pelos carcinicultores. Práticas inadequadas de manejo, como baixa qualidade da água e nutricional, densidades acima da capacidade de suporte do cultivo, somadas às intempéries ambientais, como variações bruscas na salinidade e temperatura da água, representam fatores estressores que deprimem o sistema imune dos camarões e permitem para o estabelecimento de enfermidades infecciosas.

Uma vez estabelecidas as enfermidades nos cultivos, especialmente aquelas ocasionadas por vírus e bactérias, a perda econômica subsequente será eminente, pois não há tratamentos efetivos. Portanto, um manejo adequado continua sendo a melhor forma de prevenção de enfermidades, sendo necessário promover o equilíbrio entre a saúde do hospedeiro, as condições ambientais do cultivo e as comunidades microbianas endobiontes, lembrando que, nessa complexa interação, o desequilíbrio conduz ao estabelecimento de doenças.

As doenças que causam perdas econômicas constituem um dos fatores mais limitantes para a sustentabilidade da carcinicultura mundial (ASCHE et al., 2021; KOOLOTH

VALAPPIL; STENTIFORD; BASS, 2021). Alguns patógenos causam perdas consideráveis nos cultivos de peneídeos, especialmente os vírus e as bactérias (60% e 20%, respectivamente), sendo que os fungos e os parasitos causam perdas menos significativas (FLEGEL, 2012, 2019).

Na história da carcinicultura mundial os principais vírus causadores de doenças são o vírus da síndrome mancha branca (WSSV, *White Spot Syndrome Virus*), o vírus da cabeça amarela (YHV, *Yellow Head Virus*), o vírus da síndrome de Taura (TSV, *Taura Syndrome Virus*), o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV, *Infectious Myonecrosis Virus*), o vírus da necrose hematopoiética e hipodérmica infecciosa (IHHNV, *Infectious Hypodermal and Haematopoietic Necrosis Virus*) (LIGHTNER et al., 2012). Recentemente uma nova virose está causando grandes prejuízos em cultivos na China, sendo causada pelo vírus iridescente-1 de decápodos (DIV 1, *Decapod Iridescent Virus 1*) (LIAO; HE; LI, 2022). O vírus promove atrofia e clareamento do hepatopâncreas e amolecimento da carapaça dos camarões, sinais clínicos estes partilhados por outras enfermidades, o que prejudica o diagnóstico precoce da doença (LIAO; HE; LI, 2022). Atualmente essa virose está restrita a algumas cidades da China e Tailândia (OIE, 2019).

Entre os patógenos virais acometendo os crustáceos, destaca-se o WSSV que é um vírus que pode ocasionar mortalidades nos cultivos de até 100% após 7 dias dos sintomas iniciais (KOU et al., 1998). Esse vírus é capaz de causar infecções em todos os crustáceos da ordem Decápoda, infectando células de diversos tecidos (KOU et al., 1998). Uma vez que o vírus também se replica nas células imunocompetentes (hemócitos), o sistema imunológico destes animais fica seriamente comprometido desde o início do processo infeccioso (WANG et al., 2002). As perdas econômicas na carcinicultura mundial devido às infecções por WSSV, desde o seu surgimento na Ásia em 1992, têm sido significativas e estima-se perdas de aproximadamente 1 bilhão de dólares (STENTIFORD et al., 2012). Até 2004, o Brasil era livre de infecções por WSSV. No entanto, em dezembro daquele ano, o primeiro surto foi registrado em fazendas de camarões no município de Imaruí, sul do estado de Santa Catarina (SC). A carcinicultura catarinense foi altamente impactada pela síndrome da mancha branca, cuja a produção de 4.189 t em 2004 caiu vertiginosamente nos anos seguintes, atingindo irrisórias 293.05,2 t em 2020 (EPAGRI, 2020). Desde então a atividade em SC não se estabeleceu e atualmente apenas 19 das 108 fazendas existentes em 2005 continuaram em funcionamento (EPAGRI, 2018, 2020). Na região Nordeste, redentora da maior produção de camarão marinho no Brasil, os surtos de mancha branca foram inicialmente relatados em cultivos no Sul da Bahia, em 2008 (ABCC, 2016; NUNES; FEIJÓ, 2016), sendo que o vírus se espalhou rapidamente para os estados vizinhos, reduzindo a produção em 21,2% nos últimos anos (IBGE, 2018).

Entre as bacterioses acometendo camarões, destacam-se as causadas por cepas virulentas de *Vibrio* spp., como *V. parahaemolyticus* e *V. harveyi*, responsáveis pela doença da necrose hepatopancreática aguda (AHPND, *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*), anteriormente denominada de Síndrome da Mortalidade Precoce (EMS, *Early Mortality Syndrome*) (KONDO et al., 2015; TRAN et al., 2013). A AHPND é uma doença bacteriana de grande impacto que tem causado perdas econômicas catastróficas, principalmente nos países asiáticos (China, Vietnã, Malásia e Tailândia), mas também em alguns países das Américas. Embora os registros oficiais de AHPND se concentrem no México (TANG et al., 2020), outros países da América do Sul, não revelados, são mencionados como tendo surtos desta vibriose (RESTREPO et al., 2016). No que diz respeito ao Brasil, não há registros oficiais de AHPND (OIE, 2019).

Considerações sobre o sistema imune de camarões

A exemplo de outros invertebrados, os crustáceos são desprovidos de sistema imune adaptativo composto por células linfocíticas clonais (linfócitos T e B), anticorpos e memória imunológica a longo prazo. Estes artrópodes dependem de uma imunidade do tipo inata que lhes garante ativar uma série de mecanismos moleculares e celulares de defesa contra os patógenos. Em última análise, a falta de um sistema imune adaptativo resulta na impossibilidade de se desenvolver vacinas (na concepção clássica do termo, resultando na geração de anticorpos) ou terapias baseadas no reconhecimento altamente específico de um antígeno, que os proteja contra infecções reincidentes (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; BUCHMANN, 2014).

De maneira geral, as respostas de defesa dos camarões estão intimamente ligadas ao seu sangue ou hemolinfa. O sistema circulatório é aberto ou semi-aberto e seus tecidos são banhados pela hemolinfa, que consiste em uma fração celular, composta pelas células imunocompetentes ou hemócitos e de uma fração líquida constituída pelo plasma, onde estão dissolvidos os fatores humorais (BACHÈRE et al., 2004; BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). As respostas imunológicas celulares e humorais atuam sinergicamente no combate às infecções.

Entre os mecanismos envolvidos no reconhecimento e destruição de patógenos pelos crustáceos, destacam-se: (1) reconhecimento do não-próprio por receptores/proteínas de reconhecimento- padrão (PRRs/PRPs); (2) ativação de vias de sinalização intracelular; (3) fagocitose, encapsulamento e nodulação, associadas à formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos (ETOse); (4) produção de moléculas microbicidas, como as espécies

reativas de oxigênio e de nitrogênio e os peptídeos antimicrobianos (PAMs); (5) melanização mediada pelo sistema de ativação da pró-fenoloxidase (proPO), gerando moléculas intermediárias altamente citotóxicas; (6) coagulação da hemolinfa mediada por transglutaminases; (7) reconhecimento e aglutinação celular mediada por lectinas e, (8) os sistemas antivirais mediados pela interferência por RNA (RNAi), citocinas *interferon-like*, apoptose e autofagia (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; KULKARNI et al., 2021).

A primeira barreira de proteção dos crustáceos contra a entrada de patógenos é proporcionada por uma carapaça externa rígida (exoesqueleto), que também reveste internamente o trato digestório. Além disso, o trato digestório secreta enzimas e moléculas, algumas com atividade antimicrobiana (SOONTHORNCHAI et al., 2010). Uma vez rompidas às barreiras físico-químicas, os microrganismos adentram a hemocele e desencadeiam a ativação de uma série de reações imunológicas no hospedeiro, visando neutralizar e eliminar os agentes invasores. Tais repostas são decorrentes do reconhecimento inicial do invasor pelas PRPs presentes no plasma ou na superfície das células do hospedeiro. Estas moléculas imobilizam os microrganismos se ligando aos seus padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*), e à superfície dos hemócitos. Dessa ligação, diferentes vias de sinalização intracelular são ativadas, culminando em diferentes respostas celulares (fagocitose, formação de nódulos e cápsulas e ETOse) e humorais de defesa (sistema pró-fenoloxidase, espécies reativas de oxigênio/nitrogênio e peptídeos antimicrobianos), além da modulação gênica de imunofetores e imunoreguladores (**Figura 2**) (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014; LEE; SÖDERHÄLL, 2001).

Figura 2. Respostas imunológicas induzidas nos hemócitos de camarões mediante ligação entre as proteínas de reconhecimento-padrão presente na superfície dos hemócitos com aos padrões moleculares associados a patógenos, na superfície dos microrganismos.

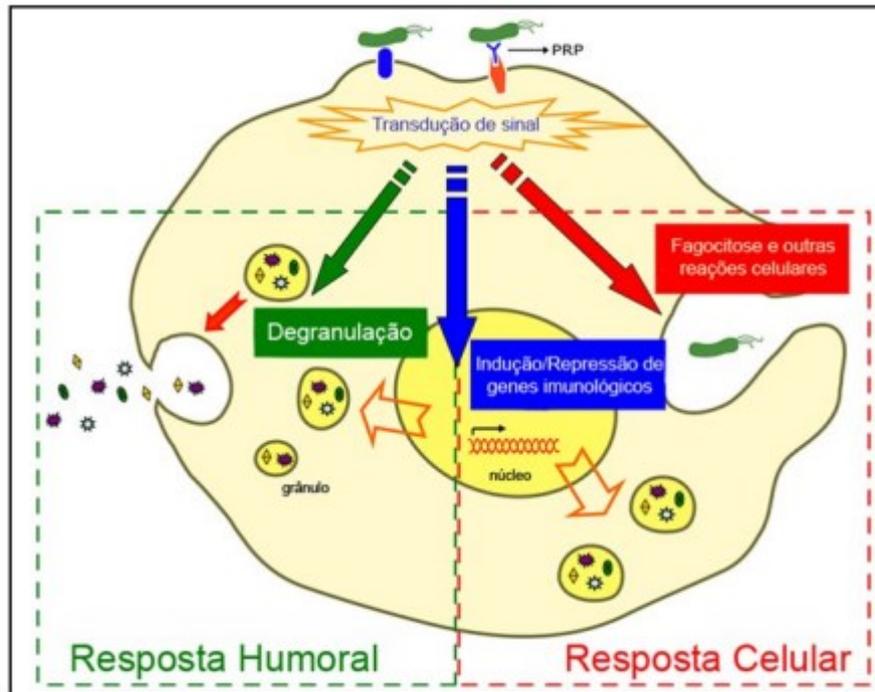


Figura 2. Após o reconhecimento dos patógenos via PRR/PRP, diferentes reações de defesa são ativadas, compreendendo: (1) resposta celulares como fagocitose, formação de nódulos e cápsulas, infiltração e formação de armadilhas extracelulares de ácidos nucleicos; (2) resposta humoral baseada na degranulação e liberação de diferentes imunofatores e imunoreguladores e, (3) indução e/ou repressão de genes associados ao sistema imune. Adaptado de Barracco, Perazzolo e Rosa (2014).

Os processos imunológicos acima mencionados são muito bem compreendidos e estão intimamente associados à hemolinfa. No entanto, recentemente tem-se voltado à atenção para uma imunidade extra-hemocitária, associada aos epitélios, como àqueles presentes no intestino. Embora muito pouco se conheça ainda sobre a existência de uma imunidade intestinal em camarões, a participação do intestino na imunidade de outros artrópodes já foi descrita, a exemplo do que ocorre nos insetos (CAPO; WILSON; DI CARA, 2019). Sabe-se que as células epiteliais do intestino médio de *Drosophila melanogaster* sintetizam moléculas antimicrobianas e citotóxicas, tais como PAMs e espécies reativas de oxigênio, fundamentais para a defesa destes animais contra microrganismos patogênicos (LEE et al., 2019).

O trato gastrointestinal dos camarões é dividido em quatro áreas funcionais: intestino anterior (incluindo a boca, esôfago e estômago), hepatopâncreas, intestino médio e intestino posterior (SOONTHORNCHAI et al., 2010) (**Figura 3**). A maioria do intestino é revestido por uma cutícula quitinosa que separa o conteúdo luminal do epitélio, protegendo-o da abrasão ocasionada pelas partículas alimentares. A exceção é a região medial do intestino revestida apenas por uma membrana peritrófica quitinosa, acelular e porosa, que permite a absorção

seletiva de nutrientes, sendo composta por fibrilas associadas às glicoproteínas e proteoglicanos (MCGAW; CURTIS, 2013; SOONTHORNCHAI et al., 2015; WANG et al., 2012).

Figura 3. Esquema representativo (fora de escala) do trato gastrointestinal, órgãos associados e sistema circulatório de camarões peneídeos

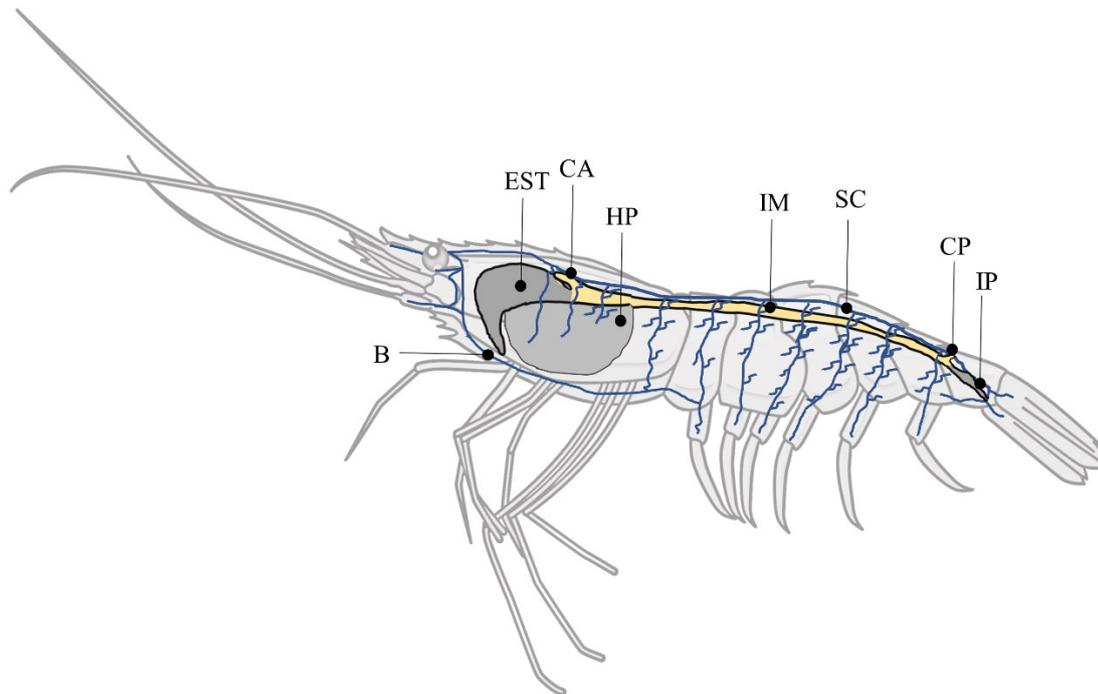


Figura 3. O trato gastrointestinal é dividido em intestino anterior (boca, esôfago e estômago), hepatopâncreas, intestino médio (contendo os cecos anterior e posterior) e intestino posterior (reto e ânus). O sistema circulatório dos crustáceos é do tipo aberto ou semi-aberto, por onde flui a hemolinfa (hemócitos e plasma). **B:** boca; **EST:** estômago ou intestino anterior; **HP:** hepatopâncreas; **SC:** Sistema circulatório; **IM:** intestino médio; **CA:** ceco anterior; **IP:** intestino posterior e **CP:** ceco posterior.

A prática de canibalismo entre os camarões é muito comum (LO; KOU, 1998) e estes animais podem facilmente infectar-se pelo trato gastrointestinal. Apesar de as barreiras físicas (cutícula quitinosa) e químicas (enzimas digestivas, baixo pH, etc.) do intestino anterior, os microrganismos podem alcançar o intestino médio, ultrapassar a barreira conferida pela membrana peritrófica e adentrar no organismo via epitélio, o que torna esta porção do intestino particularmente vulnerável aos patógenos (ARTS et al., 2007; WANG et al., 2012). Em contrapartida, acredita-se que estratégias de defesa tenham sido evolutivamente impostas ao intestino destes artrópodes, que sobrevivem há cerca de 540-490 milhões de anos em ambientes ricos em microrganismos. Apesar dessa evidência, a participação efetiva do epitélio intestinal na imunidade dos camarões está ainda por ser revelada, bem como a interação entre o seu sistema imune e a sua microbiota intestinal.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem se dedicado a estudar a imunidade associada ao intestino de camarões *L. vannamei*. O primeiro trabalho foi realizado por Silveira

e colaboradores (2018) que revelou a distribuição de transcritos associados à imunidade no trato gastrointestinal de *L. vannamei*, sugerindo a importância de hemócitos infiltrantes na comunicação entre a imunidade sistêmica (associada à hemolinfa) e a imunidade epitelial (intestino médio) em camarões (SILVEIRA et al., 2018). A partir desses primeiros achados, outros estudos se seguiram, como a participação do epitélio intestinal na produção de efetores imunológicos como os PAMs (FARIAS et al., 2019), o perfil transcricional associado a diferentes sistemas de cultivo (PILOTTO et al., 2020) e à suplementação alimentar com cianobactérias (PILOTTO et al., 2019). Mais recentemente, a expressão diferencial e espacial no intestino médio (IM) de camarões foi relatada, onde genes de diferentes categorias funcionais foram expressas, sendo a porção anterior do IM relatada como um importante sítio de expressão de moléculas antimicrobianas (GAGLIARDI, 2020). O mais recente achado no nosso laboratório foi a identificação de 13 genes com expressão exclusiva no intestino médio e não hemocitária, candidatos a compor uma assinatura transcricional do intestino médio de camarões associada ao cultivo de bioflocos e à infecção oral pelo WSSV (BERNARDO JR, 2021).

Cultivo em bioflocos como um sistema alternativo para a criação de camarões

Considerando o cenário atual da carcinicultura mundial e a importância da sanidade é premente se buscar sistemas alternativos de cultivo, que sejam compatíveis com as necessidades do século XXI e que congreguem produtividade, biossegurança e proteção ao meio ambiente. Isso inclui, a reciclagem da água dos cultivos, priorizando sistemas “fechados” em ambientes internos (*indoor*), que protejam os mananciais naturais e as áreas estuarinas da degradação e poluição decorrentes de manejos inapropriados.

Diferentes tecnologias têm se destacado no setor aquícola, ao nível mundial, para promover cultivos mais sustentáveis e produtivos. Entre elas, destacam-se o Sistema de Recirculação Aquícola (RAS, do inglês *Recirculating Aquaculture System*), Sistema de Aquaponia (*Aquaponics System*), tecnologia em Bioflocos (BFT, do inglês *Biofloc Technology System*) e o Sistema Integrado Multitrófico (IMTA, do inglês *Integrated Multi-trophic Aquaculture*) (EL-SAYED, 2021; EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013). Todos estes sistemas visam reduzir os riscos de doenças nos cultivos, adotando medidas de biossegurança e ao mesmo tempo maior produtividade, com um retorno financeiro satisfatório (EMERENCIANO et al., 2022; MOSS et al., 2012). Embora os sistemas de cultivo com estes adendos tecnológicos pareçam oferecer inúmeras vantagens em detrimento aos sistemas tradicionais (viveiros de terra) (EMERENCIANO et al., 2017a, 2022; EMERENCIANO;

GAXIOLA; CUZO, 2013), a escolha do sistema está relacionado com a viabilidade econômica do empreendedor.

A tecnologia de cultivo em bioflocos (BFT, *Biofloc Technology System*) é considerada uma alternativa aos cultivos tradicionais de camarões por apresentar características ambientalmente corretas (*eco-friendly*), sustentabilidade e por adotar medidas de biossegurança no que diz respeito a limitar a entrada de patógenos no cultivo (EL-SAYED, 2021; EMERENCIANO et al., 2017a; MOSS et al., 2012). No sistema em bioflocos há uma complexa comunidade microbiana formada não apenas por bactérias, mas também por microalgas, fungos, protozoários, zooplâncton, rotíferos, nematoides e outros organismos (EMERENCIANO et al., 2017a).

Os flocos formados (bioflocos) são fonte complementar de alimento para os animais e seu consumo pode induzir a uma maior produtividade e diminuição dos custos com alimentação, por meio da redução da taxa de conversão alimentar (EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013; MIRANDA-BAEZA et al., 2020). Os bioflocos são nutricionalmente ricos, devido a sua composição baseada em agregados de microrganismos, fibras e pequenos invertebrados (BURFORD et al., 2004; EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013; FERREIRA et al., 2021; PROMTHALE et al., 2019), podendo contribuir com até 1/3 da fonte nutricional de *L. vannamei* nos cultivos (BURFORD et al., 2004). A presença dos bioflocos na forma de alimento vivo ou como suplementação na ração tem demonstrado inúmeros benefícios (nutricionais e econômicos), sendo então uma boa alternativa para substituição parcial da farinha de peixe na formulação de rações para camarões (LEE et al., 2017; PROMTHALE et al., 2019). No aspecto nutricional, o sistema heterotrófico apresenta valores mais altos de proteína, quando comparado ao sistema quimioautotrófico e maduro no cultivo de camarão (*L. vannamei*) (FERREIRA et al., 2021), mas sem haver diferença significativas no desempenho zootécnico e sobrevivência dos animais (MARTINS et al., 2020).

Devido à redução ou inexistência de troca de água nos cultivos de bioflocos (sistema fechado), resíduos de ração, detritos e compostos nitrogenados inorgânicos se acumulam na água (BURFORD et al., 2003). Esses detritos estimulam o crescimento e o estabelecimento de comunidades bacterianas específicas, responsáveis pela reciclagem dos compostos nitrogenados (AVNIMELECH, 1999), o que melhora a qualidade da água. Nos cultivos de bioflocos pode-se encontrar três vias para reciclagem dos detritos: as vias quimioautotrófica e heterotrófica, predominantemente conduzidas por bactérias, e a via fotoautotrófica, predominantemente conduzida por microalgas e cianobactérias (DAUDA, 2020; EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006) (**Figura 4**)

Figura 4. Esquema (fora de escala) da remoção dos compostos nitrogenados no sistema de bioflocos

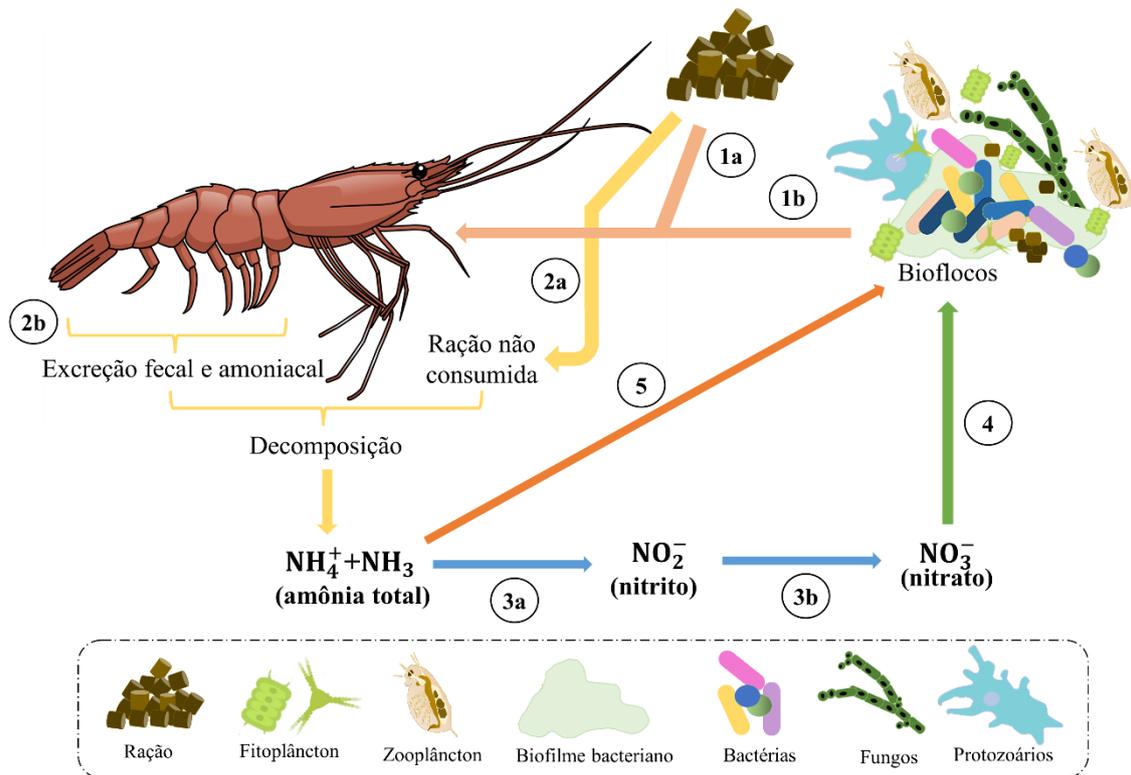


Figura 4. A reciclagem dos compostos nitrogenados nos sistemas de bioflocos ocorre por meio de três principais vias (quimioautotrófica, heterotrófica e fotoautotrófica). Os camarões são alimentados com fontes exógena (ração) (1a) e endógena (bioflocos) (1b). O acúmulo de detritos de ração não consumida (2a) e as excreções fecal e branquial (2b) promovem o aumento de compostos nitrogenados (amônia total) no sistema. A via quimioautotrófica (\rightarrow) se caracteriza pela nitrificação conduzida por bactérias oxidantes de amônia (AOB, *ammonia-oxidizing bacteria*), que oxidam a amônia total [formas ionizadas (NH_4^+) e não-ionizada (NH_3)] em nitrito (3a) que é, por sua vez, convertido em nitrito (3b) pelas bactérias oxidantes de nitrito (NOB, *nitrite-oxidizing bacteria*). Na via fotoautotrófica (\rightarrow) o nitrato será consumido por organismos fotoautotróficos aderidos aos bioflocos (4). Finalmente, na via heterotrófica (\rightarrow) a amônia não nitrificada é desviada para o metabolismo bacteriano (5).

Considerando a estabilidade química, microbiológica e a complexidade dos cultivos em bioflocos, pode-se diferenciar pelo menos duas categorias de sistemas: quimioautotrófico e heterotrófico (EMERENCIANO et al., 2022). O sistema quimioautotrófico é considerado mais equilibrado por possuir uma maior estabilidade química graças à colonização e atuação de bactérias oxidantes de amônia (*ammonia oxidizing bacteria*, AOB) e de nitrito (*nitrite oxidizing bacteria*, NOB), as quais representam as comunidades bacterianas predominantes neste sistema (AVNIMELECH, 2015; EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006). As bactérias oxidantes de amônia e nitrito são altamente eficientes na oxidação de compostos nitrogenados, que podem atingir níveis tóxicos caso não sejam removidos. Assim, no sistema quimioautotrófico permite-se que os níveis de amônia e nitrito permaneçam baixos e mais estáveis ao longo do cultivo, sendo normalmente desnecessário a inserção de fontes de carbono orgânica para sua

manutenção (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; FERREIRA et al., 2021; MARTINS et al., 2020; MIRANDA-BAEZA et al., 2020). Apesar da alta eficiência, essas bactérias desenvolvem-se muito lentamente e não produzem uma abundante biomassa, sendo necessário um tempo maior para o seu estabelecimento no sistema (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006).

No sistema heterotrófico há o predomínio de bactérias heterotróficas que necessitam constantemente da adição de fontes de carbono orgânico para que o seu metabolismo evolua (EKASARI et al., 2014). Em condições apropriadas de relação carbono-nitrogênio na água, essas bactérias assimilam rapidamente a amônia para utilizar em suas reações metabólicas, o que proporciona a rápida formação de uma abundante biomassa bacteriana no ambiente (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006). Essas bactérias são responsáveis ainda por reciclar a matéria orgânica dissolvida e abundante, além de colonizarem resíduos de fezes, exoesqueleto, restos de indivíduos mortos e ração) que será consumida junto aos bioflocos, pelos camarões (AVNIMELECH, 1999; EMERENCIANO et al., 2017a). Importante ressaltar que, independentemente da classificação do sistema, sempre haverá a presença simultânea de bactérias quimioautotróficas e heterotróficas, além de outros grupos bacterianos nos cultivos BFT, porém com o predomínio e abundância diferentes e característico de cada sistema (MARTINS et al., 2020).

Embora os mecanismos imunológicos envolvidos na condução de uma robustez dos camarões ainda não sejam bem compreendidos, uma condição de imunoestimulação contínua é esperada em ambientes de bioflocos. A abundante e constante presença de MAMPs na água de cultivo, como os lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de bactérias Gram-negativas, peptidoglicanas (PGN) e ácidos lipoteicoicos (LTA) da parede de bactérias Gram-positivas, os β -1,3- e β -1,6-glicanas da parede de fungos e as mucinas da superfície dos protozoários (**Figura 5**) atuam como “imunoestimulantes” para os animais (BOSSIER; EKASARI, 2017; HICKS et al., 2000; PILOTTO et al., 2019).

Figura 5. Principais padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) (fora de escala) presentes nos sistemas de cultivo em bioflocos

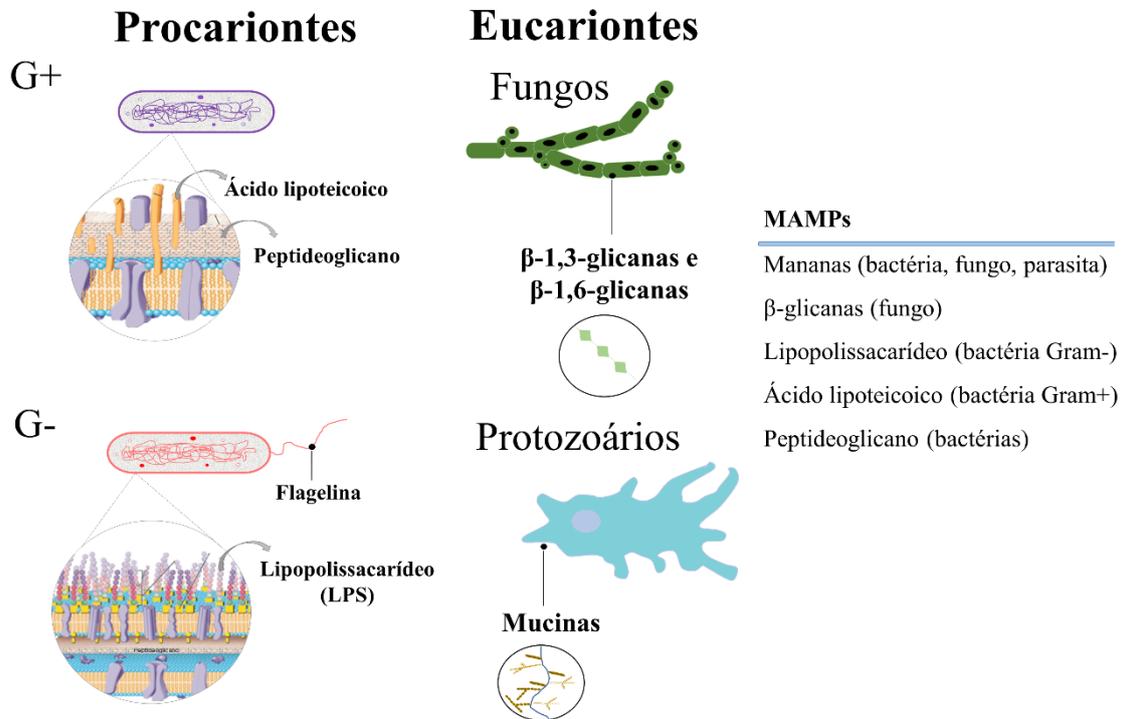


Figura 5. A presença abundante de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs), contribuem para a estimulação das defesas humorais e celulares dos camarões. Os principais MAMPs dos invertebrados são peptidoglicanas (PGN) da superfície de bactérias Gram-positivas, lipopolissacarídeos (LPS) da superfície de bactérias Gram-negativas, β -1,3-glicanas e β -1,6-glicanas na parede dos fungos e mucinas. Os MAMPs são reconhecidos e unidos aos respectivos PRPs/PRRs (Receptores de Reconhecimento Padrão) e, possivelmente, levando à imunoestimulação dos animais.

Além dos benefícios nutricionais e na qualidade da água, a comunidade microbiana que integra o sistema de bioflocos possui um potencial papel probiótico (EMERENCIANO et al., 2022) e imunoestimulador (PILOTTO et al., 2020) (**Figura 6**). Alguns estudos demonstram uma melhora na imunocompetência dos camarões cultivados em BFT frente a infecções virais (EKASARI et al., 2014; PILOTTO et al., 2018), bacterianas (AGUILERA-RIVERA et al., 2019; GUSTILATOV et al., 2022) e também, na estimulação nas defesas humorais (IUNES et al., 2021; PANIGRAHI et al., 2021) e celulares de camarões (CRAB et al., 2010). Apesar disso, os modos da ação probiótica dos bioflocos ainda não estão bem elucidados e estudos mais detalhados merecem ser conduzidos.

Com base no conhecimento atual, pode-se agrupar os principais mecanismos que agregam uma potencial ação probiótica dos sistemas de bioflocos (**Figura 6**), em: (i) presença abundante de MAMPs estimulando as defesas humorais e celulares nos camarões (PILOTTO et al., 2020; PROMTHALE et al., 2019); (ii) competição bacteriana (patogênicas x comensais)

por nutrientes do meio, favorecendo a prevalência de bactérias benéficas (CRAB et al., 2010); e, (iii) inibição do *quorum sensing* entre bactérias potencialmente patogênicas, como *Vibrio* spp., reduzindo a virulência no hospedeiro (CRAB et al., 2010; KUMAR et al., 2020).

Figura 6. Algumas respostas do hospedeiro associadas à potencial função probiótica atribuídas a componentes dos sistemas de bioflocos

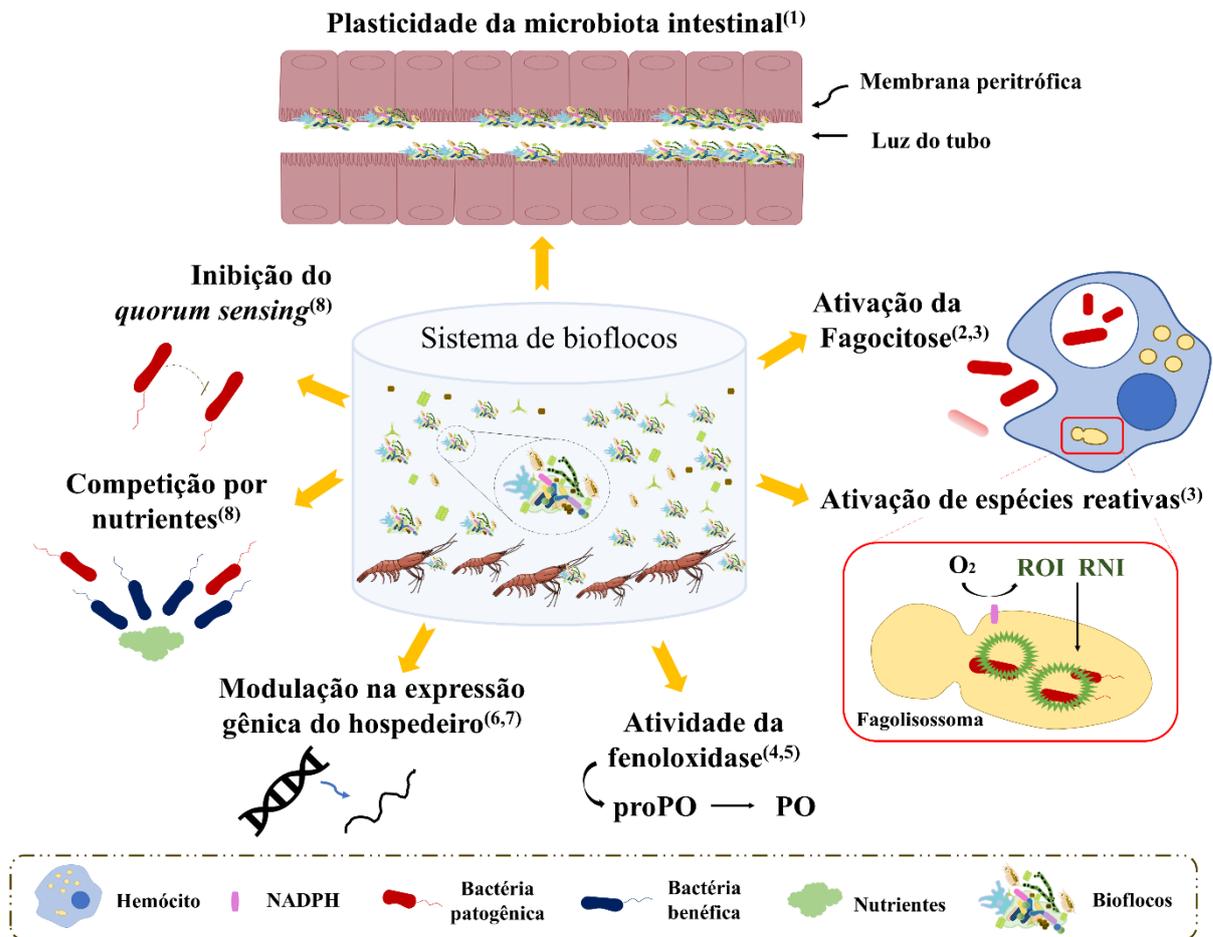


Figura 6. Relatos na literatura das principais repostas em crustáceos associadas à potencial ação probiótica do cultivo em bioflocos. **Plasticidade da microbiota intestinal:** modulação positiva na composição, diversidade e abundância do bacterioma⁽¹⁾; **Capacidade fagocítica:** aumento da capacidade fagocítica pelos hemócitos^(2,3); **Ativação de espécies reativas de oxigênio (ROIs) e nitrogênio (RNIs):** aumento da ativação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio contra *Vibrio parahaemolyticus*⁽³⁾; **Atividade da fenoloxidase:** aumento na atividade da PO, é altamente estimulada na presença de PMAPs^(4,5); **Modulação na expressão gênica do hospedeiro:** a modulação de genes associados ao sistema imune de crustáceos, podem ser atribuídas a capacidade do bioflocos de induzir alterações na microbiota do hospedeiro^(6,7); **Competição bacteriana por nutrientes:** entre espécies de *Vibrio* spp. e outras bactérias presentes no bioflocos⁽⁸⁾ e **Inibição do *quorum sensing*:** a inibição da bioluminescência via *quorum sensing* regulada por *Vibrio* spp., propiciou redução da virulência no hospedeiro⁽⁸⁾. ⁽¹⁾(PILOTTO et al., 2018); ⁽²⁾(IUNES et al., 2021); ⁽³⁾(GUSTILATOV et al., 2022); ⁽⁴⁾(AGUILERA-RIVERA et al., 2019); ⁽⁵⁾(EKASARI et al., 2014); ⁽⁶⁾(CARDONA et al., 2015); ⁽⁷⁾(KIM et al., 2014); ⁽⁸⁾(CRAB et al., 2010).

Apesar de todos os benefícios acima mencionados, nada se conhece até o momento se existe alguma alteração ou diferença nas respostas imunológicas associada(s) ao cultivo em diferentes sistemas de bioflocos, como sistemas quimioautotróficos e heterotróficos. Tendo em vista essa lacuna no conhecimento, o presente trabalho propôs avaliar a imunocompetência de juvenis *L. vannamei* cultivados em sistemas quimioautotrófico e heterotrófico de bioflocos, mediante análises moleculares de expressão gênica do hospedeiro e de bactérias colonizando o intestino médio e análises hemato-imunológicas pela análise de diferentes imunoparâmetros. Considerando que estes animais não podem ser vacinados, os sistemas de produção podem ser um aliado no controle para a prevenção de enfermidades na carcinicultura e contribuir para uma maior produtividade e desenvolvimento do setor aquícola nacional. Os resultados deste estudo sobre a imunocompetência de *L. vannamei* cultivados em sistemas de produção superintensivo (BFT) em seus diferentes graus de complexidade serão submetidos para publicação na revista *Fish & Shellfish Immunology* (F.I. 4,622).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do cultivo de camarões na imunocompetência dos juvenis em dois sistemas de bioflocos com diferentes graus de complexidade, heterotrófico e quimioautotrófico, sobre a imunocompetência de juvenis *Litopenaeus vannamei*.

1.1.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a imunocompetência dos animais por meio do hemograma (contagem total de hemócitos), atividade da fenoloxidase e título aglutinante da hemolinfa;

b) Identificar diferenças no perfil transcricional de 53 genes associados ao sistema imune no intestino médio de camarões cultivados nos dois sistemas de bioflocos;

c) Identificar diferenças no nível de transcritos 16S rRNA expressos por bactérias presentes no intestino médio de camarões, associadas ao cultivo em sistema heterotrófico e quimioautotrófico.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

AVALIAÇÃO DO ESTADO IMUNOLÓGICO DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* CULTIVADOS EM SISTEMAS DE BIOFLOCOS HETEROTRÓFICO E QUIMIOAUTOTRÓFICO

Juliana N. Ferreira¹, Talita R. Gagliardi¹, Felipe do N. Vieira², Rafael D. Rosa¹, Luciane M. Perazzolo^{1*}

¹Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

²Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

*Autor Correspondente: Tel.: +55 483721 4196; Fax: +55 48 3721 5528

E-mail: l.m.perazzolo@ufsc.br (L.M.Perazzolo)

RESUMO

O uso de medidas profiláticas visando a contenção de doenças nos cultivos e a busca por ferramentas biotecnológicas que aumentem a resistência e a imunocompetência dos peneídeos são fundamentais para a sustentabilidade da carcinicultura. O presente estudo investigou o efeito de dois diferentes sistemas de cultivos em bioflocos, heterotrófico (BFT.H) e quimioautotrófico (BFT.Q), sobre o estado imunológico geral de camarões *Litopenaeus vannamei*, por meio de análises bioquímicas (parâmetros hemato-imunológicos) e moleculares (expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio). Animais cultivados em BFT.Q apresentaram melhores condições gerais de imunocompetência que os em BFT.H, possivelmente associado às suas condições ambientais mais estáveis. Independentemente do sistema BFT, camarões cultivados em bioflocos apresentaram maior capacidade aglutinante na hemolinfa, sugerindo maior capacidade de reconhecer e imobilizar potenciais microrganismos patogênicos. Enquanto camarões em BFT.Q apresentaram expressão diferencial de genes associados às defesas antivirais (*LvDICER1*, sistema RNAi) e antimicrobianas (*LvPPAE-2* sistema proPO; *Litovan STY1* peptídeo antimicrobiano com atividade antifúngica - stylicina), o cultivo em BFT.H promoveu aumento no perfil transcricional voltado para defesas contra bactérias e fungos (*Litovan ALF-A*). Ademais, o perfil transcricional de 16S rRNA de algumas das principais comunidades bacterianas de peneídeos revelou maior abundância e viabilidade dos filos Actinobacteria e Firmicutes no intestino médio de camarões criados em BFT.Q e BFT.H, respectivamente. Curiosamente, o aumento de Firmicutes esteve associado a picos de compostos nitrogenados no BFT.H. Em conjunto, estes achados fornecem novas evidências sobre o impacto de diferentes sistemas de BFT sobre a imunocompetência e as comunidades bacterianas do intestino médio dos camarões. Por fim, esses *insights* podem auxiliar na compreensão da interação ambiente, imunidade do camarão e microbiota, visando a prevenção de doenças na carcinicultura.

Palavras-chave: Aquicultura; Aquicultura. BFT; Imunologia; Intestino médio; Peneídeo.

2.1 INTRODUÇÃO

A carcinicultura representa um dos setores do agronegócio que mais crescem no mundo, compondo a pauta de exportação de muitos países. A produção mundial de peneídeos em 2020, atingiu o recorde de 11,2 milhões de toneladas, movimentando um valor de mercado de 81,5 bilhões de dólares (FAO, 2022). Nos sistemas de produção animal, incluindo a carcinicultura, nem sempre as práticas de manejo adotadas são adequadas e respeitam a fisiologia dos animais para resultar em saúde e crescimento almejados. Fatores estressores que deprimem o sistema imune dos camarões abrem porta para o estabelecimento de enfermidades infecciosas que causam perdas econômicas constituem um dos fatores mais limitantes para a sustentabilidade da carcinicultura mundial (ASCHE et al., 2021; KOOLOTH VALAPPIL; STENTIFORD; BASS, 2021). Considerando o cenário atual da carcinicultura mundial e a importância da sanidade, é premente a busca por sistemas alternativos de cultivo, compatíveis com as necessidades do século XXI e que congreguem produtividade, biossegurança e proteção ao meio ambiente.

Nesse contexto, a tecnologia de cultivo em bioflocos (BFT, *Biofloc Technology*) é considerada uma alternativa promissora pois é ambientalmente correta (*eco-friendly*) e adota medidas de biossegurança na contenção da entrada de patógenos no cultivo (EL-SAYED, 2021; EMERENCIANO et al., 2017a; MOSS et al., 2012). Nos cultivos de bioflocos considera-se que exista, pelo menos, três vias que reciclam os detritos gerados no sistema: as vias quimioautotrófica e heterotrófica, predominantemente conduzidas por bactérias, e a via fotoautotrófica, predominantemente conduzida por microalgas além das cianobactérias (EBELING; TIMMONS; BISOGNI, 2006; EMERENCIANO et al., 2017b). As principais diferenças entre essas vias de reciclagem está o processo de conversão dos compostos nitrogenados na água, fonte de carbono utilizada, oxigenação da água e a exposição a luminosidade (DAUDA, 2020).

Outro fator relevante a se considerar é que os cultivos em bioflocos são considerados ambientes potencialmente estimuladores dos animais, devido à riqueza de microrganismos ali presentes e exposição constante dos animais aos padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs, *Microbial-Associated Molecular Patterns*) na água de cultivo (BOSSIER; EKASARI, 2017; HICKS et al., 2000; PILOTTO et al., 2019). Os modos da ação probiótica dos bioflocos ainda não estão bem elucidados e maiores estudos devem ser conduzidos, apesar de haver evidências recentes de melhora na imunocompetência dos camarões frente a infecções virais (EKASARI et al., 2014; PILOTTO et al., 2018), bacterianas (AGUILERA-RIVERA et al., 2019; GUSTILATOV et al., 2022), estimulação nas defesas

humorais (IUNES et al., 2021; PANIGRAHI et al., 2021) e celulares (CRAB et al., 2010) nos camarões.

Atualmente nosso conhecimento sobre a imunidade de crustáceos é praticamente restrita à uma imunologia sistêmica associada à hemolinfa (KULKARNI et al., 2021) e sabemos que estes artrópodes não podem ser vacinados pois possuem apenas sistema imune inato. Estudos recentes apontam que os crustáceos, a exemplo dos insetos, também possuem uma imunidade extra-hemocitária, associada aos epitélios, como àqueles presentes no intestino. Estudos pioneiros revelaram, por exemplo, a distribuição de transcritos associados à imunidade no trato gastrointestinal de *L. vannamei* submetidos a desafio bacteriano (Silveira et al., 2018). Assim, vários estudos se seguiram e a sinergia entre a imunidade epitelial e àquela conferida por hemócitos infiltrantes em camarões peneídeos é indicativo da existência de uma comunicação entre a imunidade sistêmica (associada à hemolinfa) e a epitelial (intestino médio). Essa hipótese foi corroborada por (FARIAS et al., 2019) que, em definitivo, comprovaram a participação do epitélio intestinal na produção de efetores imunológicos como os peptídeos antimicrobianos, pela síntese extra-hemocitária de stylicina. Além desse, PILOTTO et al., 2020 que relatam a expressão diferencial de genes e no intestino médio de camarões associado a diferentes sistemas de cultivo (BFT e água verde). Mais recentemente, a expressão diferencial e espacial no intestino médio (IM) de camarões foi relatada, onde genes de diferentes categorias funcionais (defesas antivirais e antimicrobianas, vias de sinalização, homeostasia) foram expressas, sendo a porção anterior do IM relatada como um importante sítio de expressão de moléculas antimicrobianas contra patógenos que adentram o camarão pela via oral. Além da identificação de 13 genes com expressão exclusiva no intestino médio e não hemocitária, candidatos a compor uma assinatura transcricional do intestino médio de camarões associada ao cultivo de bioflocos e à infecção oral pelo WSSV (dados não publicados).

Apesar de todos os benefícios acima mencionados, nada se conhece até o momento se existe alguma alteração ou diferença nas respostas imunológicas dos peneídeos associada(s) ao tipo de sistema de cultivo em bioflocos, quimioautotrófico e heterotrófico. Assim, o presente estudo investigou o estado geral de imunocompetência de juvenis *L. vannamei* cultivados em sistemas quimioautotrófico e heterotrófico de bioflocos, por meio de análises moleculares de expressão de genes associados à imunidade do hospedeiro, expressão gênica de alguns principais grupos bacterianos endobiontes de peneídeos e por meio de análises de imunoparâmetros hemato-imunológicos. Considerando que estes animais não podem ser vacinados, os sistemas de produção podem ser um grande aliado no controle para a prevenção

de enfermidades na carcinicultura e contribuir para uma maior produtividade e desenvolvimento do setor aquícola nacional.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais e delineamento experimental

Camarões *Litopenaeus vannamei* ($3 \pm 0,5$ g) de ambos os sexos e aparentemente saudáveis foram cultivados por 2,5 meses em dois diferentes sistemas de bioflocos, no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram alocados aleatoriamente em uma das seguintes condições de cultivo: (a) sistema de bioflocos quimioautotrófico; (b) sistema de bioflocos heterotrófico, e (c) água clara (controle), com uma densidade inicial de estocagem de 300 por m³. Os tanques tiveram aeração contínua (oxigênio dissolvido > 5 mg. L⁻¹) e temperatura controlada (29 ± 1 °C). Durante o cultivo, diferentes parâmetros de qualidade de água foram monitorados, tais como amônia total (mg. L⁻¹), nitrito (N-NO₂ mg. L⁻¹), alcalinidade (CaCO₃ mg. L⁻¹), sólidos totais em suspensão (SST) e salinidade (g. L⁻¹) e pH. No sistema controle, cultivo em água clara, os parâmetros não foram mensurados, uma vez que houve fluxo contínuo de água do mar filtrada. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial (Guabi Potimar, 35 % Proteína Bruta). A relação 15 C: 1 N no sistema foi mantida adicionando melão de cana no sistema heterotrófico; no sistema quimioautotrófico foi adicionado hidróxido de cálcio [Ca (OH)₂]. Os demais detalhes sobre as condições de cultivo dos animais estão descritas em (FERREIRA et al., 2021). Finalizado o período de cultivo, 30 animais (10 ± 2 g) de cada sistema foram transferidos para o Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, UFSC) e alocados separadamente em tanques de 100L, onde permaneceram em aclimação por 24h (com a água de cultivo correspondente), antes da coleta dos tecidos. O desenho experimental está apresentado na **Figura 7**.

Figura 7. Detalhes do desenho experimental.

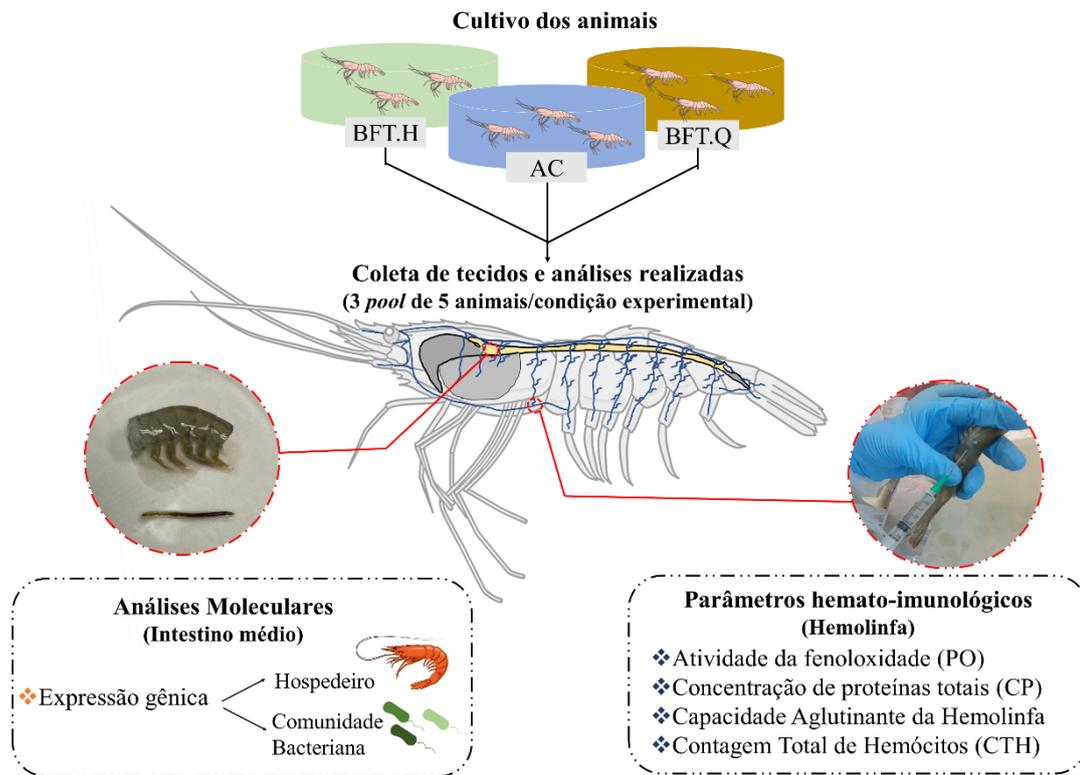


Figura 7. Camarões juvenis *Litopenaeus vannamei* ($3 \pm 0,5$ g) foram cultivados por 2,4 meses em uma das três condições experimentais: água clara (AC), sistema de bioflocos heterotrófico (BFT. H) e sistema de bioflocos quimioautotrófico (BFT. Q). Após o cultivo, os animais (10 ± 2 g) de cada condição experimental tiveram sua hemolinfa e intestino médio (IM) coletados e agrupados em três (3) pools de cinco (5) animais. As amostras foram processadas e, em seguida, realizou-se as análises moleculares (expressão gênica no IM e da comunidade bacteriana endobionte) e as análises bioquímicas com a hemolinfa [parâmetros hemato-imunológicos: atividade da fenoloxidase (PO), concentração de proteínas totais (CP), capacidade aglutinante da hemolinfa e contagem total de hemócitos (CTH)].

2.2.2 Coleta da hemolinfa e preparação do soro

A hemolinfa foi coletada da região ventral dos animais ($n=72$) na forma de 3 pools de 5 animais por condição de cultivo. Para tal, a região foi previamente higienizada com etanol 70%, e utilizou-se seringas resfriadas (1 ml) com agulha (13 x 0,4 mm) refrigerada (0°C) contendo ou não solução anticoagulante MAS (Solução de Alsever Modificada, 336 mM NaCl, 115 mM glicose, 27 mM de sódio, 9 mM EDTA, pH 7,2), na proporção 1:2 (hemolinfa: MAS). A hemolinfa coletada em MAS foi acrescida de MAS-formol e utilizada para obtenção dos hemócitos para uso posterior na Contagem Total de Hemócitos (CTH) (item 2.5). O soro foi obtido a partir de hemolinfa coletada sem anticoagulante, onde a hemolinfa foi deixada coagular por 1 hora a 20°C . O coágulo formado foi macerado com bastão de vidro e a mistura

centrifugada repetidamente a $6.000 \times g$ por 10 min, a 4°C . O precipitado foi então descartado, o sobrenadante aliqotado e estocado a -20°C , para uso posterior (atividade da fenoloxidase, concentração de proteínas totais e capacidade aglutinante).

2.2.3 Atividade da fenoloxidase (PO) e concentração de proteínas totais (CP)

A atividade da enzima PO de cada *pool* de amostras foi avaliada com $50 \mu\text{L}$ de soro diluído $15 \times$ em TBS-PO (50 mM Tris, 330 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , pH 7,4) depositados em microplacas de fundo chato e em presença de $50 \mu\text{L}$ de tripsina (1 mg/mL, em água ultrapura). Após 5 min de incubação a 20°C , igual volume do substrato enzimático L-DOPA ($3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, em água ultrapura) foi adicionado e a formação do pigmento vermelhocroral DOPA-cromo foi quantificada em leitora de microplaca a $\lambda = 490 \text{ nm}$ (Multileitora Infinite M200 TECAN), nos tempos 0, 5 e 10 min.

Todos os ensaios foram realizados em quintuplicata. A atividade da PO foi expressa pela variação da absorbância por minuto por miligrama de proteína, onde uma unidade da atividade enzimática corresponde ao aumento de 0,001 na absorbância por minuto e por miligrama de proteína (SODERHALL; HALL, 1984).

A concentração de proteínas totais do soro de cada *pool* de amostras, foi determinada pelo método de ensaio do ácido bicinconínico, Kit Pierce BCA Protein Assay (*Thermo Fisher Scientific*), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como proteína-padrão. Utilizou-se o protocolo para microplacas, preconizado pelo fabricante. Para tal, foi utilizado soro diluído $1.000 \times$ e a absorbância mensurada em leitora de microplacas (Multileitora Infinite M200 TECAN) a $\lambda = 520 \text{ nm}$. Os ensaios foram realizados em triplicatas

2.2.4 Capacidade aglutinante da hemolinfa

A titulação de lectinas/aglutininas na hemolinfa dos camarões foi avaliada em cada *pool* de amostras, utilizando-se $50 \mu\text{L}$ de soro depositados em microplacas de 96 poços (fundo em “U”), sendo serialmente diluído em tampão TBS-Lec (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 5mM MgCl_2 , pH 7,4). As amostras foram incubadas com igual volume de uma suspensão de eritrócitos de cão (2%), por 1,5 h a 20°C , em câmara úmida e, nos poços controle, o soro foi substituído por tampão. O título aglutinante natural do soro foi expresso como o

recíproco da maior diluição ainda capaz de apresentar aglutinação. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

2.2.5 Contagem total de hemócitos (CTH)

Alíquotas de 100 μ L de hemolinfa em MAS (1: 2 v/v) de cada 3 *pool* de 5 animais/condição experimental foi acrescida de mesmo volume de MAS-formol (concentração final 4% formaldeído) e realizada a contagem total de hemócitos em câmara de Neubauer, utilizando-se o campo de contagem para leucócitos (BEÇAK; PAULETE, 1976). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

2.2.6 Coleta e processamento dos intestinos médios (IM)

A dissecação dos IM foi realizada individualmente após os camarões serem sacrificados por hipotermia (0 °C por 15 min), lavados em uma solução Tris-NaCl (10 mM Tris, 330 mM NaCl, pH 7.4) visando a remoção do conteúdo intestinal e armazenadas em RNAlater™ (Sigma-Aldrich®) a -80 °C, na forma 3 *pools* de 5 animais/condição experimental. Posteriormente, os *pools* foram retirados do RNAlater, lavados com Tris-NaCl e macerados em TRIzol (Thermo Scientific®) (1:10, p/v). Após centrifugação a 12.000 \times g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante de cada *pool* de amostra foi coletado e armazenado a -20 °C, para a etapa de extração de RNA total.

2.2.7 Extração de RNA total e síntese de cDNA

O RNA total de cada *pool* de amostras foi extraído utilizando o reagente TRIzol (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (Thermo Fisher Scientific) a 37°C por 30 min, visando a eliminação de DNA genômico (gDNA) contaminante. Após a inativação da DNase I com EDTA 5 mM à 65 °C por 10 min, as amostras foram precipitadas com 0,3 M acetato de sódio (pH 5,2). A qualidade e a concentração dos RNAs total extraídos foram determinadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% e espectrofotometria, respectivamente.

Para a síntese do DNA complementar (cDNA), 2 μ g de RNA total foi reversamente transcrito (volume final 20 μ L), na presença de 200 U da enzima RevertAid Reverse

Transcriptase™ (*Thermo Scientific*®), 0,5 mM de dNTP Mix (Sinapse®), 20 U da enzima RiboLock™ RNase Inhibitor (*Thermo Scientific*®) e 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Bioline®) (para as análises de expressão gênica do hospedeiro) ou 0,5 µg de oligo(dT)₁₂₋₁₈ acrescido de 0,3 µg de oligonucleotídeos Random Primers (Invitrogen) (para as análises de expressão gênica bacteriana). As amostras foram incubadas a 42 °C por 60 min e a enzima inativada a 65 °C, por 15 min. As amostras de cDNA foram armazenadas a -20 °C, para utilização posterior das análises de expressão gênica do hospedeiro e bacteriana.

2.2.8 Transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

As análises quantitativas de expressão gênica foram realizadas a partir de reações de transcrição reversa seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (*Thermo Fisher Scientific*®). Para as análises de expressão gênica foram escolhidos 56 genes, compreendendo 3 genes de referência e 53 genes pertencentes às diferentes categorias funcionais associadas ao sistema imune de crustáceos, sendo elas: (i) Peptídeos antimicrobianos - PAMs (16 genes), (ii) Vias de sinalização celular (11 genes); (iii) Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos - PRPs (5 genes); (iv) Defesa antiviral (6 genes); (v) Sistema de ativação da proPO (3 genes); (vi) Defesa antioxidante (5 genes) (vii) Homeostasia (3 genes); (viii) Citocinas (2 genes) e (ix) Inibidores de proteases (2 genes). As sequências dos iniciadores utilizados estão apresentadas no **Quadro 1**.

As reações ocorreram em um volume final de 15 µL, contendo 1 µL de cDNA (diluído 1:20), 0,2 µM de cada iniciador e 7,5 µL de mix da reação (Maxima SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2×™ (*Thermo Fisher Scientific*®)). Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e hibridização/extensão a 60 °C por 1 min. A especificidade das reações foi confirmada pela análise de curvas de dissociação (60-95 °C; 0,3 °C/s), realizada após as etapas de amplificação. Os valores médios da expressão de três genes de referência (*LvEF1α*, *LvActin* e *LvRpS3A*) foram utilizados para a normalização dos dados como anteriormente descrito (FARIAS et al., 2019). Os valores de expressão relativa foram calculados com base nos valores de Cq dos genes de interesse em relação aos valores de Cq da referência ($\Delta Cq = Cq$ do gene alvo subtraído do Cq da referência). A expressão relativa dos genes alvos (BFT. Q × BFT. H) foi calibrado com o perfil de expressão de camarões cultivados em AC (água clara; grupo

experimental controle), sendo os níveis de expressão calculados através da fórmula $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As análises foram realizadas em duplicata.

2.2.9 Quantificação absoluta de transcritos bacterianos por RT-qPCR

As análises quantitativas de transcritos bacterianos 16S rRNA foram realizadas a partir da transcrição reversa dos RNAm de cada *pool* de amostra, seguida por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) (item 2.7). Para isso, utilizou-se plasmídeos contendo genes específicos dos filos Actinobacteria, Bacterioidetes ou Firmicutes, das classes Alphaproteobacteria ou Gammaproteobacteria e, para o gênero *Vibrio* spp. (Quadro 2). Uma curva de calibração foi confeccionada para cada plasmídeo (contendo as sequências de interesse), compreendendo os pontos de curva de 10^8 a 10^2 plasmídeos/ μ L. Os plasmídeos foram quantificados por espectrofotometria (Nanovue) e, em seguida, calculado o número de moléculas/ μ L, seguindo a constante de Avogadro. Simultaneamente, 1 μ L de cDNA (diluído 1:10) de cada *pool* de IM por condição experimental foi adicionada na microplaca e a análise realizada em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems (*Thermo Fisher Scientific*®). O volume final de cada reação foi 15 μ L, contendo 1 μ L de cDNA, 0,2 μ M de cada iniciador (BACCHETTI DE GREGORIS et al., 2011) e 7,5 μ L de Maxima Sybr Green/ROX Master Mix 2 \times (*Thermo Scientific*). Todas as reações foram realizadas em triplicatas (curvas de diluição) ou duplicatas (amostras). Para a amplificação, foram utilizadas as seguintes condições: desnaturação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 s e hibridização/extensão a 60 °C por 1 min. As reações foram realizadas no equipamento StepOnePlus Real-Time PCR Systems (*Applied Biosystems*) e os valores finais foram calculados no programa *StepOne software* v2.3.

2.2.10 Análise estatística

Os dados obtidos na aferição dos parâmetros de qualidade da água nos sistemas de bioflocos quimioautotrófico e heterotrófico, foram analisados com o teste não paramétrico de Mann-Whitney (amônia, nitrito e sólidos totais em suspensão) ou paramétrico *t*-Student, para dados não-pareados (pH e salinidade). O título aglutinante de cada *pool* de soro, foi previamente transformado em Log_2 e analisados pelo teste de Kruskal-Wallis com *post-hoc* de Dunn. Os demais dados referentes aos parâmetros hemato-imunológicos avaliados (atividade da

fenoloxidase, concentração de proteínas totais e a contagem total de hemócitos) foram analisados com o teste *One-way* ANOVA utilizando *post-hoc* de Tukey.

Diferenças na expressão gênica do hospedeiro foram consideradas estatisticamente significantes com $P \leq 0,05$ (*cutoff* de *2-fold change* no nível de expressão) usando teste *t-Student* não pareado. O programa RefFinder (<https://www.heartcure.com.au/reffinder/>) foi utilizado para a escolha da melhor condição de referência entre três genes candidatos: *LvRp3A*, *LvEF1 α* e actina *LvActin*. A escolha foi baseada no cálculo do coeficiente de estabilidade dos genes candidatos utilizando o programa *RefFinder*, que leva em consideração a variação dos valores de Cq entre as diferenças amostras. Assim, quanto menor o valor do coeficiente, menor a variação de expressão do gene de referência entre as condições experimentais. Para uma análise mais apurada, foi considerada ainda a média geométrica dos valores de Cq das diferentes combinações dos genes candidatos (VANDESOMPELE et al., 2002). No caso dos transcritos bacterianos, os valores da expressão foram calculados em número de cópias de rRNA por ng de RNA total e transformados em Log₁₀, realizando-se testes paramétricos *One-way* ANOVA (filo Bacteriodete, gênero *Vibrio* spp. e classe Gammaproteobacteria) ou *t* Student (filo Actinobacteria) ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (filo Firmicutes e classe Alfaproteobacteria), utilizando *post-hoc* de Dunn ou Tukey, para dados não paramétricos ou paramétricos, respectivamente.

Todos os dados obtidos foram testados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A escolha dos testes estatísticos foi baseada na normalidade dos dados e nas premissas dos testes estatísticos (CALLEGARI-JACQUES, 2003). Para a construção dos gráficos e para a realização das análises estatísticas, foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.4.2 (*GraphPad Software, Inc.*). O *heat map* foi gerado usando o *software* ClustVis (<https://biit.cs.ut.ee/clustvis/>) (METSALU; VILO, 2015). As análises e as nomenclaturas utilizadas neste trabalho foram baseadas nas recomendações do MIQE guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 O perfil da qualidade da água demonstrou diferenças entre os sistemas de bioflocos

Diferentes parâmetros de qualidade da água foram avaliados ao longo dos 72 dias de cultivo de camarões nos dois sistemas de bioflocos (quimioautotrófico e heterotrófico). De uma forma geral, o ambiente do sistema BFT.Q apresentou um perfil mais estável dos compostos

nitrogenados ao longo de todo o cultivo de *L. vannamei*. A concentração média de amônia total no ambiente BFT.H foi superior ($2,33 \pm 3,65 \text{ mg. mL}^{-1}$) àquela registrada no sistema BFT.Q ($0,30 \pm 0,16 \text{ mg. mL}^{-1}$), que foi mais estável ao longo do cultivo (**Figura 8A**). Curiosamente, um pico foi registrado próximo ao final do cultivo em BFT.H, atingindo valor de $14,52 \text{ mg. mL}^{-1}$. Perfil similar foi encontrado em relação ao nitrito dissolvido, que mostrou ser mais estável no ambiente BFT.Q, enquanto que em BFT.H registrou-se dois picos de nitrito, nos 39° e 72° dias de cultivo (**Figura 8B**). As médias dos outros parâmetros de qualidade de água avaliados [alcalinidade, sólidos totais em suspensão (SST), salinidade e pH], não se alteraram significativamente, permanecendo semelhantes em ambos os sistemas BFT (**Tabela 1**).

Figura 8. Variação dos níveis de amônia total e nitrito ao longo de um cultivo de juvenis *Litopenaeus vannamei* em dois sistemas de bioflocos.

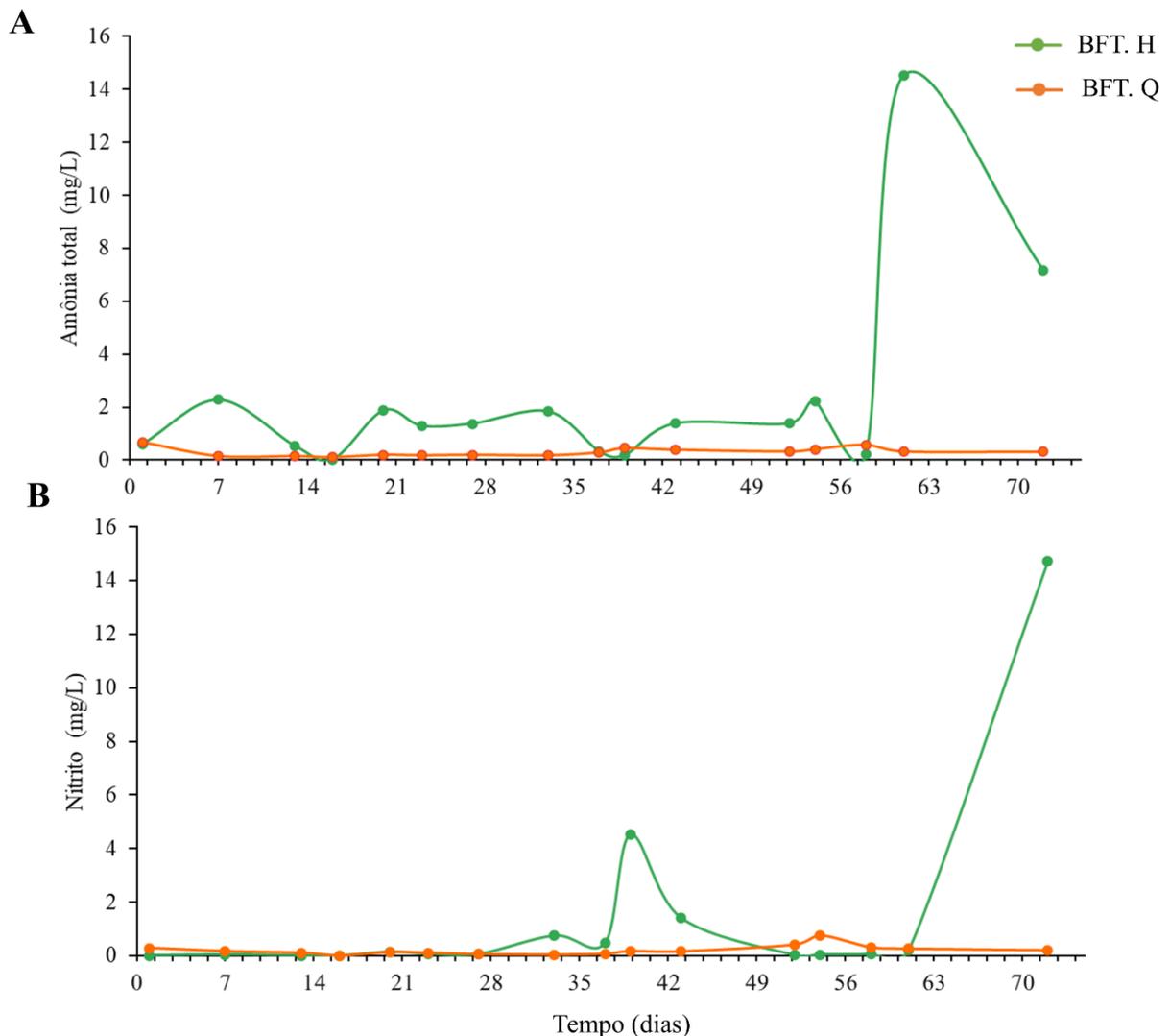


Figura 8. Níveis de amônia total (A) e de nitrito (B) na água de cultivo de camarão em bioflocos, sistema heterotrófico (BFT.H) e sistema quimioautotrófico (BFT.Q), ao longo de 72 dias de cultivo.

Tabela 1. Variáveis de parâmetros de qualidade da água nos sistemas quimioautotrófico e heterotrófico no cultivo de *L. vannamei* em bioflocos.

Parâmetros	Condições experimentais	
	BFT. Q	BFT. H
Amônia Total (mg.L ⁻¹)	0,30 ± 0,16	2,33 ± 3,6*
Nitrito (N-NO ₂ - mg.L ⁻¹)	0,20 ± 0,18	1,41 ± 3,7
Alcalinidade (mg CaCO ₃ .L ⁻¹)	153 ± 24,3	165,1 ± 21,8
SST (mg.L ⁻¹)	610 ± 322,2	637,6 ± 373,4
Salinidade (ppm)	37,8 ± 2,02	37 ± 2,2
pH	7,9 ± 0,18	7,8 ± 0,15

Tabela 1. Média ± desvio padrão das variáveis de qualidade da água após 2,5 meses de cultivo experimental de juvenis de *Litopenaeus vannamei* em diferentes sistemas [quimioautotrófico (BFT.Q) e heterotrófico (BFT.H)]. * $p < 0,05$.

2.3.2 Algumas respostas imunológicas dos camarões foram alteradas em função do tipo de sistema de cultivo em bioflocos

A fim de avaliar diferenças nas repostas imunológicas dos camarões relacionado ao sistema de cultivo em bioflocos, quimioautotrófico e heterotrófico, a atividade da pró-fenoloxidase (PO) e capacidade aglutinante da hemolinfa foram analisadas como respostas humorais e, a contagem de hemócitos totais (CTH), como resposta celular (**Figura 9**). A média do número de hemócitos circulantes na hemolinfa dos animais cultivados em BFT.Q ($48,8 \pm 4,4 \times 10^6$ céls. mL⁻¹) foi cerca do dobro daquele registrado no grupo BFT. H ($18,8 \pm 1,4 \times 10^6$ céls. mL⁻¹) e 1,25 vezes maior que nos animais do grupo controle, em água clara ($39 \pm 2,1 \times 10^6$ céls. mL⁻¹). De maneira interessante, o título aglutinante da hemolinfa foi semelhante entre os camarões independente do sistema de bioflocos [BFT.Q (título aglutinante $1536 \times$ e $768 \times$; $\text{Log}_2 = 10 \pm 0,5$); BFT. H (título aglutinante $1536 \times$ e $3072 \times$; $\text{Log}_2 = 11,2 \pm 0,5$)], sendo que apenas os animais do sistema heterotrófico apresentaram uma capacidade aglutinante superior aos animais controle [AC (título aglutinante $384 \times$ e $768 \times$; $\text{Log}_2 = 9 \pm 0,5$)] (**Figura 9**).

Relação oposta foi observada na atividade enzimática da fenoloxidase (PO), com valores muito baixos nos camarões cultivados em BFT.H ($6,6 \pm 2,6$ U/min/mg), quando comparado aos animais em água clara, AC ($22,26 \pm 12,2$ U/min/mg) que apresentaram maior atividade da PO. Porém, os animais do BFT.Q ($14,9 \pm 5,1$ U/min/mg) apresentaram atividade semelhante tanto aos animais cultivados em água clara quanto os animais cultivados no BFT.H. Em relação à concentração proteica do soro, valores similares deste imunoparâmetro foram

encontrados em camarões cultivados em BFT.Q ($174,5 \pm 13,0 \text{ mg. mL}^{-1}$) e AC ($179,4 \pm 28,7 \text{ mg. mL}^{-1}$). No entanto, os animais cultivados no BFT.H ($111,7 \pm 2,14 \text{ mg. mL}^{-1}$) apresentaram uma menor concentração proteica na hemolinfa que àquela dos animais cultivados em BFT.Q e grupo controle, AC (**Figura 9**).

Figura 9. Avaliação de diferentes parâmetros hemato-imunológicos em juvenis de *Litopenaeus vannamei* após o cultivo em sistemas de bioflocos quimioautotrófico e heterotrófico.

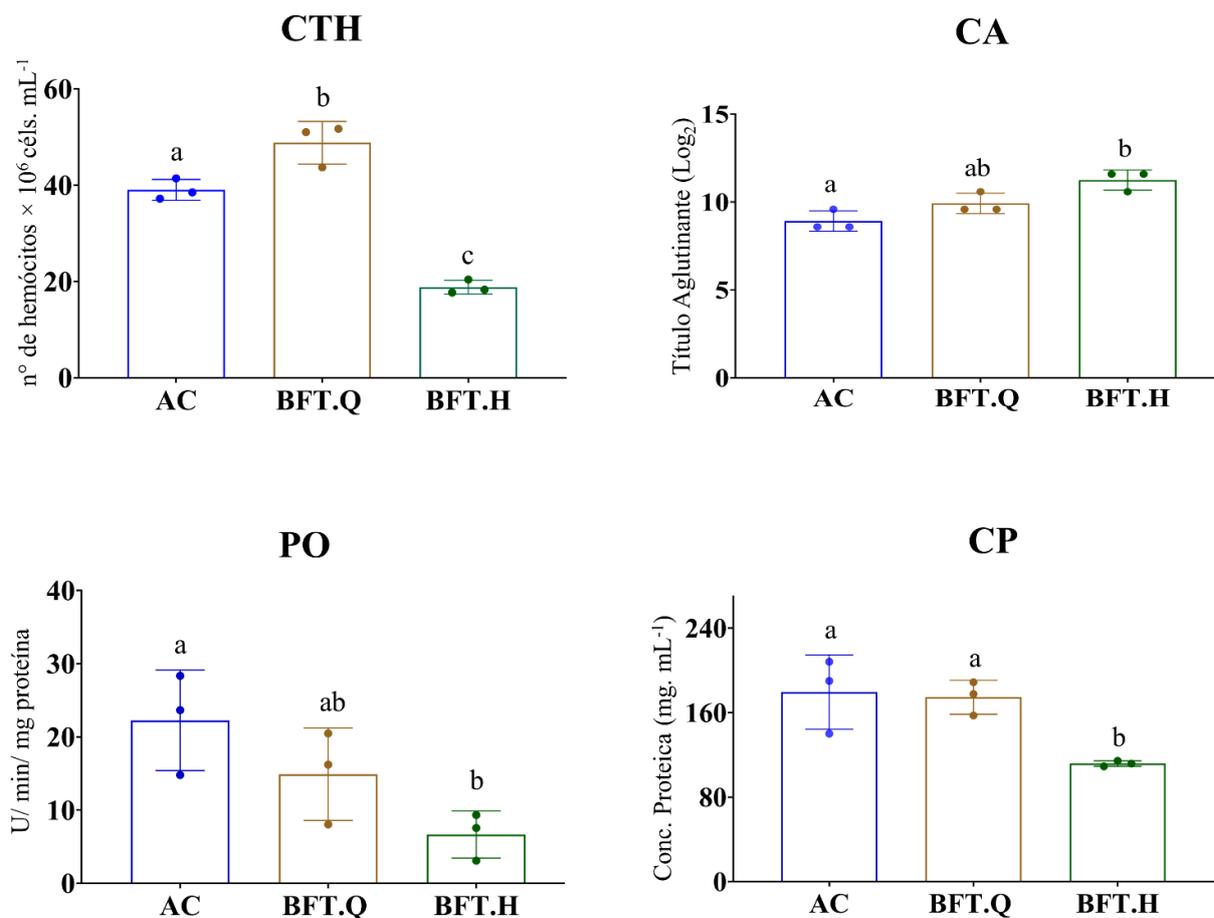


Figura 9. Camarões cultivados por 2,5 meses em sistemas de bioflocos quimioautotrófico (BFT.Q), heterotrófico (BFT.H), e em água clara (AC, grupo controle), foram amostrados (n= 3 pools de 5 animais/ tratamento) e avaliados os seguintes imunoparâmetros: contagem de hemócitos totais (CTH), capacidade aglutinante da hemolinfa (CA), atividade da fenoloxidase (PO) e concentração de proteínas totais do soro (CP). As barras representam a média ± desvio padrão. As letras minúsculas representam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos.

2.3.3 Alguns genes do sistema imune apresentaram expressão diferencial associada ao tipo de sistema de cultivo em bioflocos

Considerando o conhecimento ainda limitado sobre a imunidade intestinal de peneídeos e não sabendo se existem diferenças entre o perfil transcricional em camarões cultivados em BFT.Q e BFT.H, no presente estudo avaliou-se a expressão de 53 genes associados ao sistema imune de *L. vannamei*, pertencentes a 9 categorias fisiológicas. Inicialmente, realizou-se a escolha da melhor condição de referência para os cálculos de expressão relativa, a partir da expressão dos três genes candidatos (proteína ribossomal *LvRp3A*, *LvEF1 α* e actina *LvActin*). A condição que apresentou a menor variação de expressão foi a média geométrica dos três genes em conjunto (*LvRp3A*, *LvEF1 α* e *LvActin*; coeficiente de estabilidade =1), como demonstrado na **Figura 10**.

Figura 10. Coeficiente de estabilidade dos valores de Cq dos genes e da média geométrica de suas diferentes combinações.

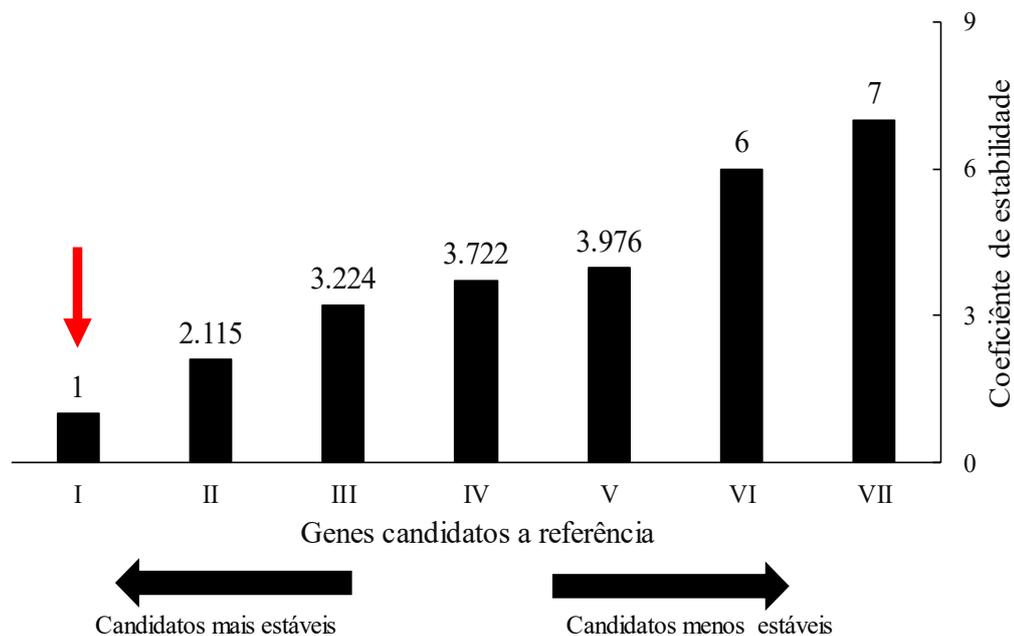


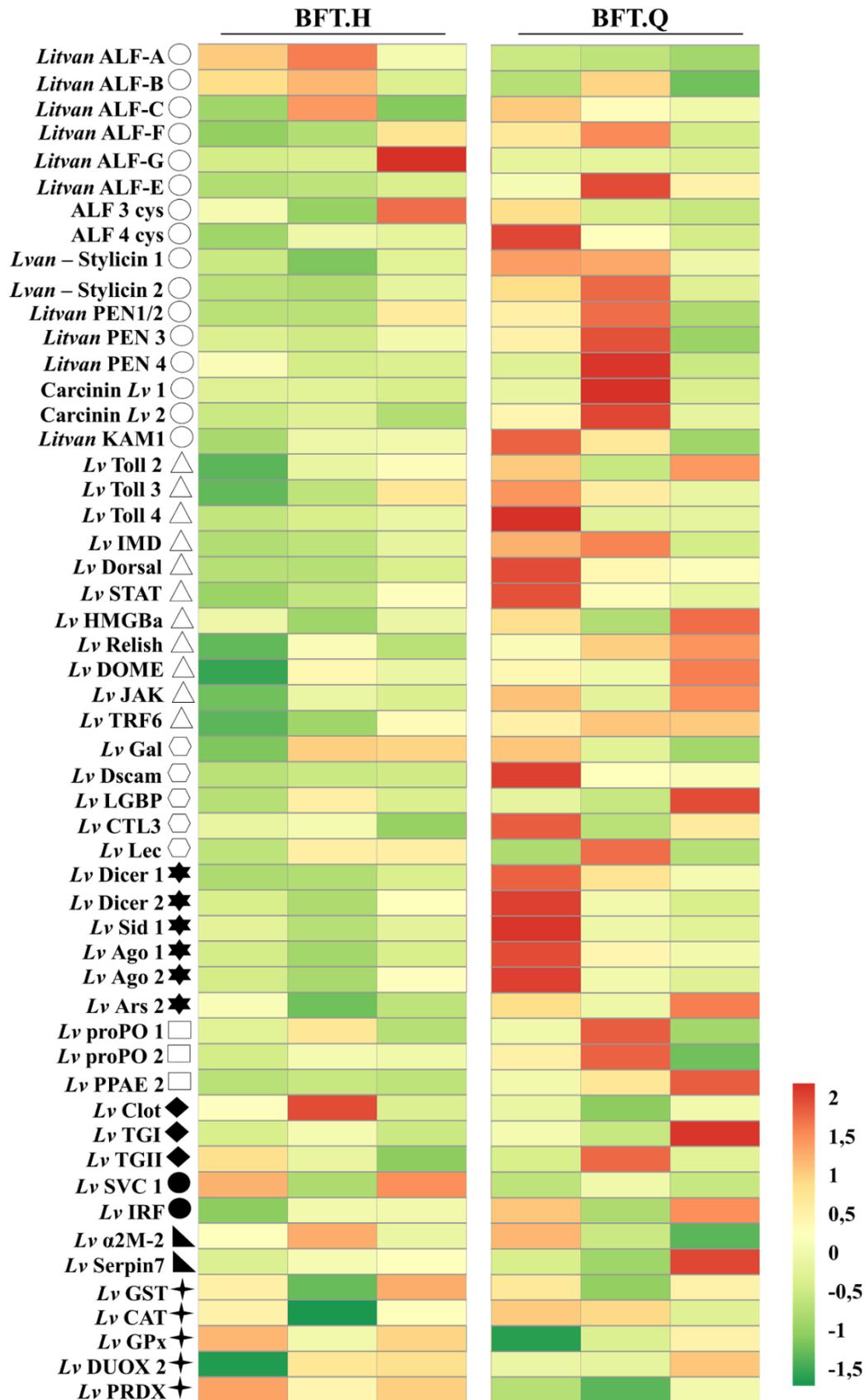
Figura 10. (I) *LvEF1 α* , *LvRpS3A* e *LvActin* (melhor estabilidade indicada pela seta vermelha) (II) *LvRpS3A* e *LvActin* (III) *LvEF1 α* e *LvRpS3A* (IV) *LvEF1 α* e *LvActin* (V) *LvEF1 α* (VI) *LvActin* e (VII) *LvRpS3A*.

Para uma melhor compreensão, os resultados de expressão gênica serão apresentados da seguinte maneira: inicialmente será apresentada a análise global da expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio (IM) de camarões cultivados em sistema heterotrófico (BFT. H) e quimioautotrófico (BFT.Q) (**Figura 11**). Em seguida, será apresentada

a análise dos genes que foram diferencialmente expressos, considerando o perfil transcricional no IM dos camarões nas condições BFT. Q em comparação à condição BFT.H (Figura 12). Ademais, serão apresentadas a expressão quantitativa de transcritos do gene codificante para o 16S rRNA de alguns dos principais grupos bacterianos colonizando o IM dos camarões (filos Actinobacteria, Bacteriodetes e Firmicutes, classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria e gênero *Vibrio* spp.) (Figuras 13 e 14).

Todos os 53 genes associados ao sistema imune avaliados foram expressos no IM dos camarões, porém em diferentes níveis, denotando uma relação com o sistema BFT que o animal foi cultivado. A análise revelou ainda que no IM dos animais cultivados no BFT.Q houve uma tendência geral de aumento na expressão de genes de várias categorias, comparado aos animais em BFT.H, como pode ser constatado pelas células em tons laranjas e avermelhados no *heatmap* (Figura 11). Pode-se ressaltar aqui que os genes com maior tendência de expressão nos animais em BFT.Q foram os das categorias de peptídeos antimicrobianos, vias de sinalização celular, proteínas de reconhecimento-padrão, defesa antiviral e sistema de ativação da proPO. Foi também observado que alguns genes nos animais em BFT.H tiveram uma maior tendência de expressão em relação ao BFT.Q, em especial os da categoria de peptídeos antimicrobianos e de defesa antioxidante (Figura 11).

Figura 11. Análise global da expressão de genes associados ao sistema imune no intestino médio de *Litopenaeus vannamei*.



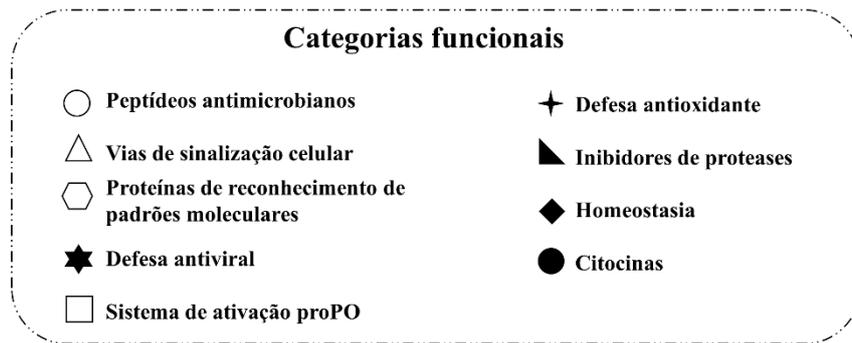


Figura 11. *Heatmap* apresentando o perfil transcricional de 53 genes pertencentes a 9 categorias de genes associados ao sistema imune, no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em dois sistemas de bioflocos (BFT.H: heterotrófico; BFT.Q: quimioautotrófico). O nível de expressão relativa dos genes-alvo foi normalizado com os genes de referência (*LvEF1 α* , *LvActin* e *LvRpS3A*) e calibrado com os dados do grupo controle (água clara), sendo que cada coluna no gráfico corresponde a uma expressão da triplicata biológica de uma condição experimental. A intensidade da cor indica a magnitude de expressão (alta= vermelho; baixa= verde), baseada na escala de cor presente na lateral inferior, à direita do gráfico. As células do *heatmap* não apresentam nenhuma significância estatística, mas sim servem de guia para visualizar diferenças na expressão entre as réplicas de cada grupo.

Ao considerar a expressão diferencial no intestino médio de camarões cultivados em diferentes sistemas de BFT, destacaram-se apenas quatro genes; nos animais do sistema quimioautotrófico três genes tiveram expressão superior no IM quando comparado àqueles em sistema heterotrófico: o peptídeo antimicrobiano *Litvan* STY1, a endoribonuclease *Lv* Dicer1 (associado ao sistema antiviral RNAi) e a enzima ativadora da pró-fenoloxidase, *Lv* PPAE2 (*fold change* 2,3x, 2,4x e 3,4x, respectivamente). No caso dos animais cultivados no sistema heterotrófico, um gene apenas apresentou expressão superior no IM, quando comparado ao cultivo em sistema quimioautotrófico: o peptídeo antimicrobiano *Litvan* ALF-A (*fold change* 2,1 x).

Figura 12. Genes diferencialmente expressos no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados em diferentes sistemas de bioflocos.

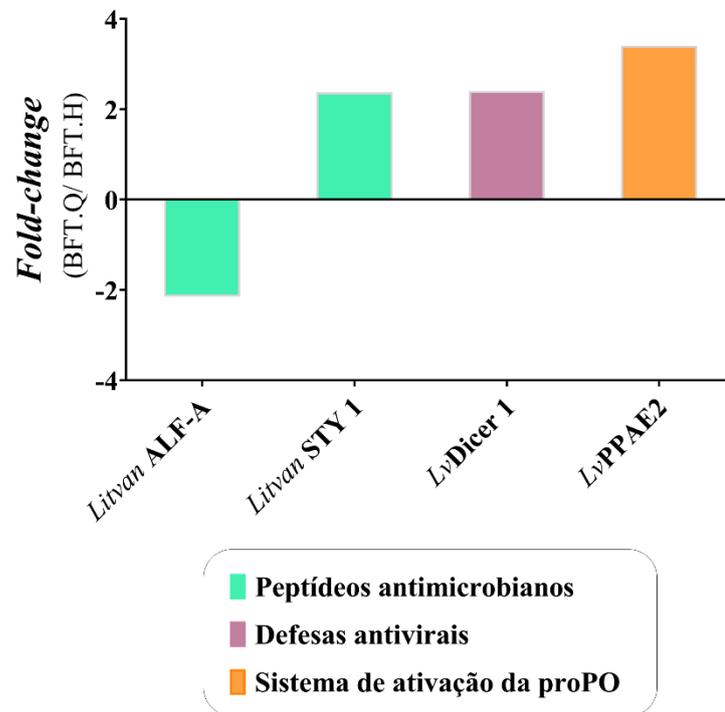


Figura 12. Expressão diferencial de genes relacionados ao sistema imune considerando as comparações entre camarões cultivados em sistema quimioautotrófico (BFT.Q) e animais cultivados em sistema heterotrófico (BFT. H). Os valores de expressão gênica estão apresentados em *fold-change* ≥ 2 e $p \leq 0,05$.

2.3.4 A abundância dos transcritos do gene 16S rRNA variou entre as comunidades bacterianas endobiontes em função do sistema de cultivo em bioflocos

Além da expressão de genes no IM do hospedeiro, foi avaliado simultaneamente nas mesmas amostras, a expressão de transcritos bacterianos do gene 16S rRNA, utilizando iniciadores que amplificam regiões conservadas específicas dos filos, classes e gênero bacterianos de interesse para a carcinicultura (**Figura 13**). A quantificação por RT-qPCR forneceu informações combinadas da abundância e da viabilidade bacterianas no intestino dos animais, portanto, sendo eficiente para quantificar bactérias intestinais viáveis.

No intestino médio dos camarões cultivados em diferentes ambientes (BFT.Q, BFT.H e AC) foram encontradas diferenças ao nível de transcritos 16S rRNA pertencentes aos filos Actinobacteria e Firmicutes e à classe Alphaproteobacteria (**Figura 13**). Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada na transcrição do 16S rRNA do filo Bacteroidetes, da classe

Gammaproteobacteria e de representantes do gênero *Vibrio* spp (**Figura 13**). No sistema quimioautotrófico houve um predomínio de expressão de transcritos do filo Actinobacteria, comparado aos camarões do sistema heterotrófico e em água clara. Por outro lado, nos camarões em sistema heterotrófico os transcritos de Firmicutes foram mais abundantes, quando comparado aos animais em BFT.Q e AC. Embora os camarões em BFT.Q tenham apresentado um maior nível de transcritos da classe Alphaproteobacteria, comparado aos animais controle (AC), a transcrição foi equivalente àquela dos animais em BFT.H. Surpreendentemente, os animais em água clara tiveram a transcrição do 16S rRNA de Actinobacteria abaixo do limite de detecção da técnica (**Figura 13**). Resumidamente, o perfil de transcrição diferencial do gene 16S rRNA no IM de camarões cultivados nas três condições avaliadas foi: Actinobactéria (BFT.Q > BFT.H > AC), Firmicutes (BFT.H > BFT.Q = AC) e Alphaproteobacteria (BFT.Q > AC = BFT.H) (**Figura 13**).

Figura 13. Quantificação absoluta dos transcritos bacterianos no intestino médio de camarões cultivados em AC (água clara), BFT.Q (quimioautotrófico) e BFT.H (heterotrófico).

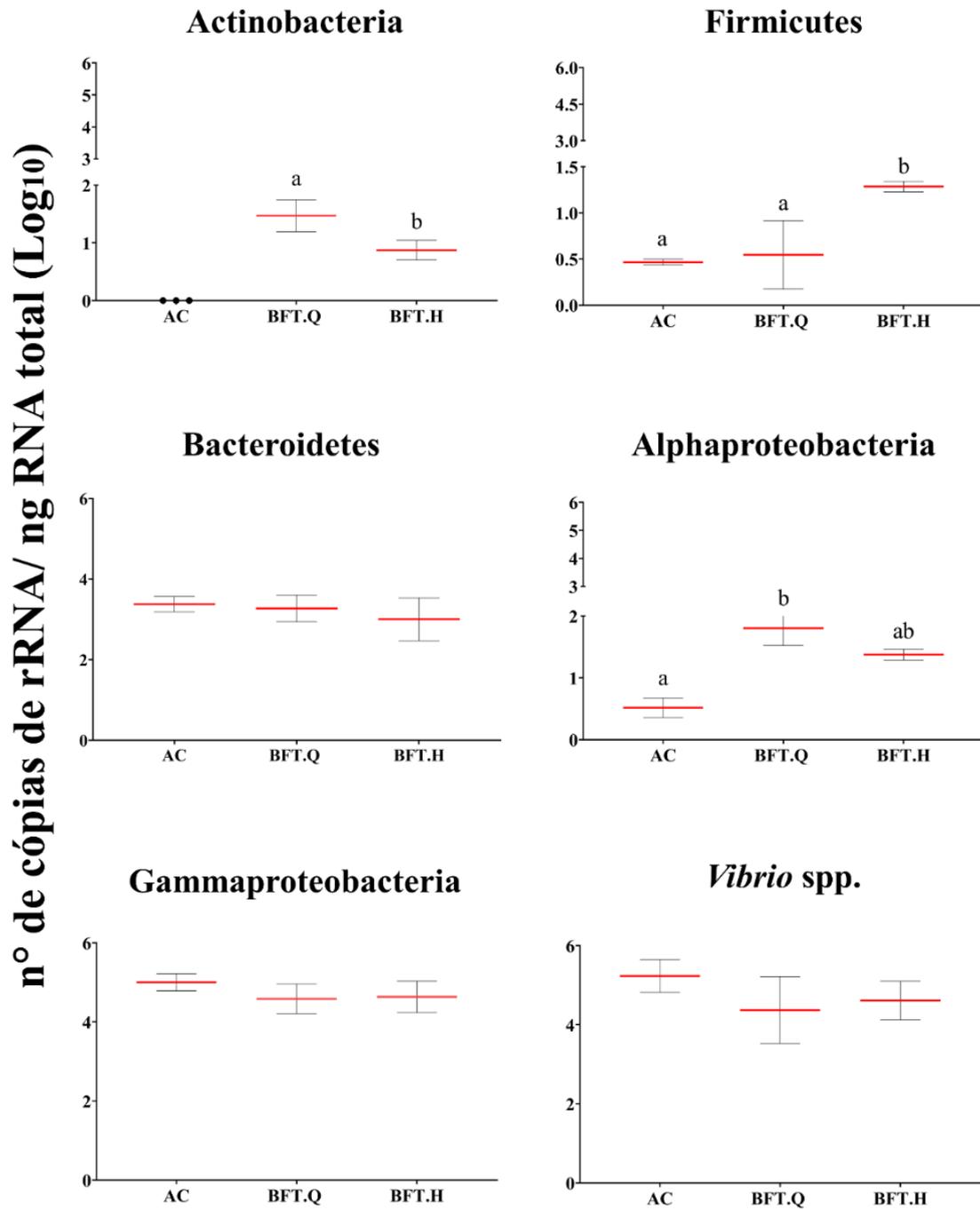


Figura 13. Quantificação absoluta dos transcritos bacterianos no intestino médio de camarões cultivados foi realizada por RT-qPCR, utilizando uma curva-padrão derivada de uma diluição seriada de plasmídeos contendo a sequência do DNA-alvo. Os valores estão expressos numa escala de Log10 cópias do gene bacteriano do RNA ribossomal 16S / ng RNA total.

Esses mesmos resultados, quando visualizados em termos de abundância relativa percentual de transcritos 16S rRNA, demonstram que foram dois os grupos mais abundantes no IM dos camarões cultivados em bioflocos (BFT.Q e BFT.H): Gammaproteobacteria e Bacteriodetes, seguido pela Classe Alphaproteobacteria, e os filos Firmicutes e Actinobacteria (**Figura 14**). Os únicos grupos bacterianos que apresentaram diferença transcricional no IM dos animais, considerando o tipo de sistema BFT, foram os filos Actinobacteria e Firmicutes. Nos demais grupos bacterianos avaliados, a transcrição mostrou-se similar entre eles. Apesar de não haver diferenças de transcritos da classe Alphaproteobacteria no IM dos camarões em BFT, animais cultivados em BFT.Q apresentaram uma maior abundância relativa (11,24%) quando comparado àqueles do sistema BFT.H (8,72%) (**Figura 14**).

Figura 14. Visão geral da abundância relativa percentual do nível de transcritos 16SrRNA específicos para alguns grupos bacterianos ocorrendo no intestino médio de *Litopenaeus vannamei* cultivados em diferentes sistemas

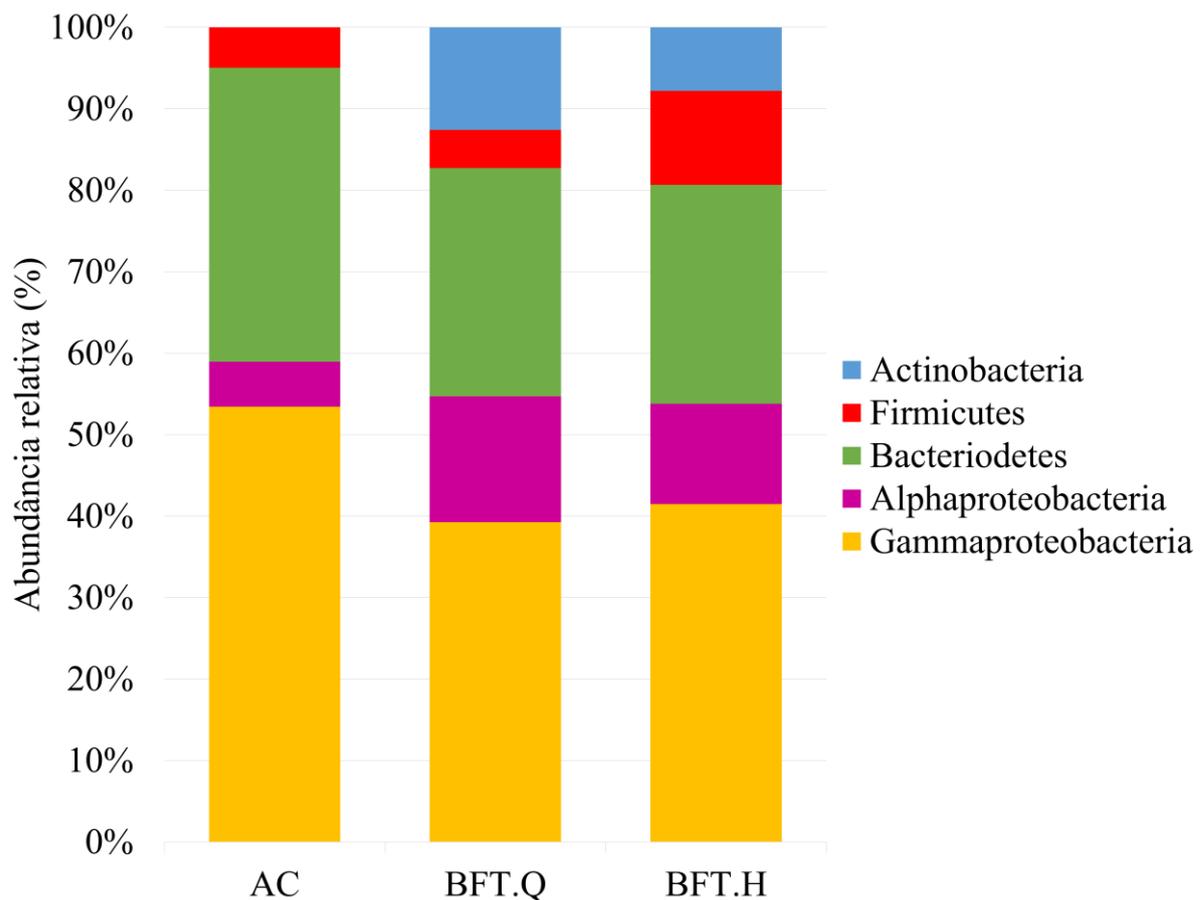


Figura 14. Percentual da abundância relativa de transcritos 16S rRNA dos filos Actinobacteria, Firmicutes e Bacteriodetes e das classes Alphaproteobacteria e Gammaproteobacteria expressos no intestino médio de camarões cultivados em água clara (AC), sistema de bioflocos quimioautotrófico (BFT.Q) ou sistema de bioflocos

heterotrófico (BFT.H). Os valores percentuais correspondem ao número de cópias de 16S rRNA por ng de RNA total em Log_{10} de cada grupo.

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, a imunocompetência de camarões *L. vannamei* cultivados em diferentes sistemas de BFT [quimioautotrófico (BFT.Q) e heterotrófico (BFT.H)] e água clara (AC) foi avaliada mediante análises hemato-imunológicas (imunoparâmetros) e moleculares (expressão gênica do hospedeiro e bactérias endobiontes). Durante o período do cultivo (72 dias), diferentes parâmetros de qualidade de água também foram avaliados e sua relação com os resultados obtidos das análises bioquímicas e moleculares serão aqui discutidos.

De uma forma geral, o ambiente BFT.Q apresentou um perfil mais estável de compostos nitrogenados (amônia total e nitrito) que o ambiente BFT.H, no que lhe concerne, apresentou valores médios superiores, acima dos níveis recomendados ($< 1 \text{ mg. mL}^{-1}$) (EMERENCIANO et al., 2017a). Curiosamente, os dois picos pontuais e agudos de amônia total e nitrito registrados em BFT.H denotam ser este um ambiente mais estressor para os animais e que de maior instabilidade em comparação ao BFT.Q. Resultados similares foram encontrados em estudos anteriores por outros grupos (FERREIRA et al., 2021; MARTINS et al., 2020), cujos valores médios de compostos nitrogenados foram inferiores ao longo do cultivo, quando comparados com sistemas quimioautotrófico e maduro em BFT. Esse perfil observado em sistemas heterotróficos pode estar relacionado com a redução da disponibilidade do carbono orgânico no ambiente, que acaba por influenciar negativamente na redução da amônia total nesse sistema (KHANJANI; ALIZADEH; SHARIFINIA, 2021; SERRA et al., 2015).

O nível de toxicidade da amônia total é influenciado pelo pH, salinidade e temperatura da água (ZHAO et al., 2020) e, no presente estudo, estes parâmetros se mantiveram em concentrações ideais (veja **Tabela 1**) para cultivos de *L. vannamei* em sistema de bioflocos (EMERENCIANO et al., 2017a). Embora a concentração de sólidos totais em suspensão (TSS) não tenha apresentado diferenças significativas nos sistemas BFT avaliados, a média esteve 1,2 vezes acima do recomendado ($\leq 500 \text{ mg.mL}^{-1}$), podendo esse também ser um fator estressor para os animais (EMERENCIANO et al., 2017a; SCHVEITZER et al., 2014). Em conjunto, os dados de parâmetros de qualidade da água sugerem que o sistema BFT.Q apresentou condições mais propícias para o cultivo de juvenis de *L. vannamei*, segundo parâmetros definidos por (EMERENCIANO et al., 2017a).

Em relação às análises hemato-imunológicas, nossos achados demonstram que o cultivo de camarões no sistema heterotrófico de bioflocos esteve relacionado à diminuição do número de células imunocompetentes (hemócitos) na circulação (CTH) dos animais, comparado aos animais criados em BFT.Q ou em água clara (AC). A diminuição de cerca de 2 vezes no hemograma esteve associada à condição ambiental desfavorável no cultivo BFT.H, cuja concentração de compostos nitrogenados esteve, ao longo do cultivo, acima dos valores recomendados (EMERENCIANO et al., 2017a). O aumento abrupto da amônia no final do cultivo, com concentração de 14,52 mg. mL⁻¹ e dois aumentos abruptos do nitrito (4,52 e 14,72 mg. mL⁻¹) sugerem que a queda no hemograma dos animais em BFT.H possa ter sido devido as suas condições ambientais mais desafiantes. Efetivamente, a diminuição do CTH já foi relatada em crustáceos expostos a condições ambientais estressoras, tais como altas concentrações de amônia (LIU et al., 2021b; ZHANG et al., 2018), baixa salinidade (LI; YEH; CHEN, 2010), baixa temperatura (QIU et al., 2011) ou baixa concentração de oxigênio dissolvido (LE MOULLAC et al., 1998). Em outro estudo, o CTH dos animais criados no sistema heterotrófico aumentou ao longo do tempo, implicando em um estímulo de produção ou liberação de hemócitos, embora os camarões em sistema de água clara, como no nosso caso, tenha apresentado CTH maior do que os camarões em sistema heterotrófico, após 60 dias de criação (IUNES et al., 2021). Nesse mesmo estudo, observou-se aumento de grupos bacterianos no trato digestório dos camarões, o que pode ter induzido à migração hemocitária para a mucosa intestinal e, assim, reduzindo as células circulantes na hemolinfa (IUNES et al., 2021). Isso pode também ter acontecido em nosso estudo, contudo faltam evidências para comprovar essa hipótese. Maiores estudos sobre estimulação hematopoiética em camarões criados em sistemas heterotróficos ajudarão a elucidar essa questão.

Os relatos na literatura acerca do *status* imunológico de camarões cultivados em diferentes sistemas de bioflocos são ainda bastante escassos. Por outro lado, existem alguns estudos que utilizam análises imuno-bioquímicas em animais cultivados em sistema de bioflocos em diferentes condições, considerando: diferentes densidades de estocagem (LIU et al., 2017), inserção de produtos com ação imunoestimulante (ex.: probióticos, cepas bacterianas específicas e simbióticos) (HUSSAIN et al., 2021; PANIGRAHI et al., 2021), desafios virais (EKASARI et al., 2014) e bacterianos (GUSTILATOV et al., 2022). Um estudo abordando análises hemato-bioquímicas (proteína, glicose, colesterol, acilglicerídeos, lactato e superóxido dismutase) em *L. vannamei* foi realizado por (DE JESÚS BECERRA-DORAME et al., 2014), comparando animais em sistemas autotrófico e heterotrófico de cultivo em bioflocos.

Em relação à capacidade aglutinante do soro de *L. vannamei* não registramos diferenças entre os cultivos BFT.H e BFT.Q. Contudo, animais cultivados em ambos sistemas possuíram maior capacidade aglutinante que os animais na condição controle (AC). Essa maior capacidade aglutinante pode estar associada a uma imunestimulação contínua dos animais em bioflocos, que representa ambiente rico em diferentes MAMPs. Sabe-se, por exemplo, que as aglutininas, incluindo diferentes lectinas, são PRPs que reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos da superfície de diferentes microrganismos, causando sua aglutinação (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Até o momento, se conhece sete grupos de lectinas encontradas em camarões, do tipo -C, -I, -P e -M, galectinas, lectinas de domínio semelhante ao fibrinogênio e calnexina (JOHNSON et al., 2022). Nesse estudo ficou demonstrado que as aglutininas poderiam estar sendo expressas em maior quantidade nos animais em BFT, sendo que BFT.Q houve também uma tendência de aumento na expressão de três genes codificantes para aglutininas (*LvGal*, *LvLec* e *LvCTL3*). Devido a enorme diversidade de aglutininas/lectinas presentes nos crustáceos, não se sabe quais grupos estão relacionados com o aumento da capacidade aglutinante aqui registrado dos animais cultivados nos sistemas BFT. Vale ressaltar que mais estudos devem ser realizados pra elucidar quais foram as aglutininas/lectinas, sua especificidade e função.

No presente estudo, os valores de atividade da PO registrados foram em geral baixos, quando comparados a outros estudos com juvenis *L. vannamei* (CANTELLI et al., 2019; PILOTTO et al., 2019). Surpreendentemente, camarões cultivados em ambos sistemas BFT tiveram atividade da PO bastante inferior àquela dos animais em água clara, especialmente os cultivados em BFT.H. Possivelmente o menor número de hemócitos circulantes nesses animais tenha relação com a baixa atividade da PO no soro, considerando que as formas zimogênicas se encontram confinadas nestas células. Semelhante aos nossos achados, Chen e colaboradores (2012) também relataram redução de ambos hemogramas e atividade da PO em camarões *L. vannamei* após exposição a estresse amoniacal. De maneira geral, nossos resultados de imunoparâmetros sinalizam que houve alterações importantes na imunidade de camarões cultivados em BFT.H, possivelmente decorrente da instabilidade ambiental neste sistema e que animais em BFT.Q apresentaram uma condição de imunocompetência aparentemente melhor. Estudos futuros com desafios microbianos poderiam corroborar esta hipótese. Vale ainda ressaltar que os estudos disponíveis sobre a regulação desses imunoparâmetros são de difícil comparação com a literatura disponível, devido às diferenças metodológicas entre os estudos.

Os estudos abordando imunidade em camarões são praticamente restritos à imunidade sistêmica, mediada pelas células imunocompetentes (hemócitos) e pelos efetores/indutores

imunológicos solúveis no plasma. Entretanto, estudos mais recentes indicam que o epitélio do intestino médio dos camarões seja possivelmente um importante sítio de expressão de genes associados ao sistema imune, considerando ser este tecido uma porta de entrada para patógenos (PILOTTO et al., 2018). Assim, a interação entre o sistema imune, a microbiota endobionte e o ambiente é fundamental para estimular tanto a imunidade sistêmica, quanto a imunidade intestinal em camarões (PILOTTO et al., 2018).

Com o intuito de melhor conhecer a influência dos sistemas de cultivo em bioflocos sobre a imunidade intestinal, o presente estudo avaliou o perfil de expressão de diferentes genes no intestino médio de camarões cultivados em BFT.H e BFT.Q. Como resultado relevante, encontramos uma diferença no perfil transcricional geral no intestino médio de *L. vannamei* associada ao tipo de sistema de cultivo: BFT.Q ou BFT.H. Notavelmente, o nível de expressão gênica da maioria das categorias funcionais avaliadas foi superior nos animais em BFT.Q comparado aos em BFT.H, sugerindo novamente uma condição nestes animais de melhor imunocompetência, o que reforça os resultados com os imunoparâmetros. Os animais no sistema quimioautotrófico tiveram três genes com expressão superior no IM, comparado aos em sistema heterotrófico: o peptídeo antimicrobiano *Litvan* STY1, a endoribonuclease *Lv* Dicer1 (associado ao sistema antiviral RNAi) e a enzima ativadora da pró-fenoloxidase, *Lv* PPAE2 (*folds change* 2,3x, 2,4x e 3,4x, respectivamente). No caso dos animais cultivados em sistema heterotrófico, apenas um gene apresentou expressão superior no IM, quando comparado ao cultivo em sistema quimioautotrófico: o peptídeo antimicrobiano, *Litvan* ALF-A. Sendo assim, quatro dos 53 genes avaliados tiveram expressão diferencial entre os grupos BFT. Cabe salientar que os parâmetros adotados para considerar expressão diferencial entre os grupos, além da significância estatística ($p < 0,05$), foi a expressão gênica igual ou superior a 2. Esse valor é considerado restritivo por alguns autores, uma vez que o *cut off* $\geq 1,5$ é frequentemente adotado (LIU et al., 2021a; ZHANG; ZHANG; WANG, 2021). Dito isso, podemos concluir que, baseados nos resultados do *heatmap* que apresenta uma visão geral da expressão entre os grupos calibrados com o controle (em água clara), um maior número de genes poderia ter sido considerado tendo expressão diferencial se os parâmetros adotados aqui tivessem sido menos restritivos. Como previsto, uma variação nos níveis de expressão foi encontrada entre as réplicas biológicas de uma mesma condição experimental, indicando o grande polimorfismo genético associado ao sistema imune dos invertebrados. Esse perfil também foi encontrado tanto em genes expressos por hemócitos (GONÇALVES et al., 2014), quanto no intestino médio de *L. vannamei* (PILOTTO et al., 2020) e também, pelos hemócitos da ostra *Crassostrea gigas* (ROSA et al., 2012).

Após o reconhecimento dos MAMPs pelas proteínas de reconhecimento padrão do hospedeiro, diversos mecanismos celulares e humorais podem ser ativados (BARRACCO; PERAZZOLO; ROSA, 2014). Essas defesas antimicrobianas são geralmente mediadas por hemócitos (ROSA; BARRACCO, 2010), mas também por células epiteliais das brânquias (ALENTON et al., 2019) e intestino médio (FARIAS et al., 2019) dos crustáceos. As principais características dos peptídeos antimicrobianos (PAMs) são a rápida capacidade inibitória e potente contra um amplo espectro de microrganismos, incluindo fungos, leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e em alguns casos contra vírus e protozoários (BACHÈRE et al., 2004; ROSA; BARRACCO, 2010). Atualmente, cinco famílias de AMPs caracterizadas em hemócitos são reconhecidas em peneídeos, sendo elas: peneidinas, crustinas, ALFs (fator anti-lipopolissacarídeos), kammaricinas e as stylicinas (ARGENA, 2020; MATOS; ROSA, 2021).

De forma interessante, a maioria dos peptídeos antimicrobianos avaliados nos animais cultivados em ambos sistemas de BFT apresentaram tendência ou diferenças significativas em sua expressão. Especialmente animais em BFT.Q, os genes pertencentes às famílias PAMs apresentaram uma tendência de aumento, sendo que a expressão do gene codificante para a stylicina do tipo 1 (*Litvan* STY 1) foi superior comparado aos em BFT.H. Esse PAM apresenta uma forte atividade antifúngica contra fungos filamentosos (*Fusarium oxysporum*) e, em testes *in vitro*, se liga a LPS aglutinando bactérias Gram-negativas, tais como *Vibrio penaeidae*, que são potencialmente patogênicas para camarões (ROLLAND et al., 2010). Uma maior expressão do gene codificante para esse PAM em animais cultivados em BFT.H poderia sugerir que estes animais estariam mais bem preparados para desafios fúngicos e com bactérias Gram-negativas. Contudo, essa hipótese poderia ser confirmada mediante desafios microbianos. Stylicinas são PAMs constitutivamente expressos pelos hemócitos de camarões, embora recentemente tenha sido demonstrado que em *L. vannamei*, as células epiteliais colunares do intestino médio também produzem essa molécula (FARIAS et al., 2019).

De maneira geral, animais cultivados em sistema BFT.H apresentaram uma expressão aumentada de genes da família dos ALFs (categorias A, B, C, F e G) no IM. Contudo, apenas *Litvan* ALF-A teve uma expressão significativamente maior, comparado aos animais em BFT.Q. ALF-A possui ampla atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungo (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2016; MATOS et al., 2018; MATOS; ROSA, 2021). De maneira interessante, no IM destes mesmos animais (BFT.H) registrou-se um aumento expressivo de transcritos 16S RNAr do filo Firmicutes que contempla diferentes bactérias Gram positivas. Indiretamente, poderíamos hipotetizar que a presença de bactérias Gram-positivas no IM dos camarões sinalizaria para um aumento na expressão de ALF-A.

Contudo, estudos mais específicos de identificação das bactérias colonizando o IM dos camarões seriam necessários.

Não podemos descartar a outra hipótese que o aumento da expressão do gene *Litvan* ALF-A esteja relacionado com a ingestão constante dos “bioflocos” do sistema BFT (EMERENCIANO; GAXIOLA; CUZO, 2013), que facilitaria a entrada de bactérias pelo trato gastrointestinal. Como demonstrado no trabalho de Tepasamordech e colaboradores (2020), 93,35% da abundância bacteriana total na água do bioflocos foram principalmente dos gêneros *Vibrio* spp, seguida de *Pseudoalteromonas* spp, *Photobacterium* spp, *Shewanella* spp e *Alteromonas* spp. As espécies mais abundantes do gênero *Vibrio*, foram *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (TEPAAMORNDECH et al., 2020). Vale ressaltar, que são gêneros e espécies consideradas patógenos oportunistas, que em situações vantajosas podem comprometer a saúde do hospedeiro (MORALES-COVARRUBIAS, 2018). Assim sendo, podemos hipotetizar que a ingestão constante desses grupos bacterianos no sistema BFT.H podem ter contribuído para maior expressão da ALF-A nesse sistema.

Como demonstrado em estudos anteriores, o aumento na expressão de *Litvan* ALF-A no intestino médio de *L. vannamei* esteve associado à infecção sistêmica por *Vibrio harveyi* (SILVEIRA et al., 2018), *Vibrio penaeicida* ou pelo fungo *Fusarium oxysporum* (DE LA VEGA et al., 2008), além de redução de 3,4 vezes da expressão na porção anterior do intestino médio após infecção oral com o WSSV (GAGLIARDI, 2020). Além disso, o gene ALF-A tem sua expressão muito aumentada (cerca de 6x) em animais cultivados em BFT, comparado aos cultivos em água verde (PILOTTO et al., 2020).

Em relação às defesas antivirais, os crustáceos contam principalmente com o sistema mediado pela interferência de RNA (RNAi) (BARTHOLOMAY et al., 2012). Mais uma vez, animais em BFT.Q demonstraram, no geral, possuir uma expressão dos genes desta categoria aumentada; o gene codificante para a endoribonuclease Dicer 1 (*Lv* Dicer 1) foi 2,4x mais expresso no IM dos animais no BFT.Q quando comparado aos animais no BFT.H. Em outro estudo do nosso grupo, o *Lv* Dicer1 também foi mais expresso no IM de camarões cultivados em água verde (cultivo tradicional) e sob infecção crônica com vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), quando comparados a animais saudáveis e cultivados em BFT (PILOTTO et al., 2020). Além disso, vale ressaltar que camarões após desafio com TSV (Vírus da Síndrome de Taura) o nível de expressão da Dicer 1 foi regulado positivamente nos hemócitos, atingindo seu máximo de expressão até 24 horas após infecção com posterior diminuição, sem haver mudanças significativas da expressão após 36 horas de infecção (YAO et al., 2010).

Algumas hipóteses foram levantadas para explicar o aumento da expressão do gene Dicer 1 no intestino médio de camarões cultivados em BFT.Q. Uma delas está relacionada com o possível migração dos hemócitos para o intestino médio de *L. vannamei* (SILVEIRA et al., 2018), aumentando a quantidade de transcritos no IM desses animais, pois se sabe que os hemócitos apresentam maior quantidade de transcritos de Dicer, quando comparado a outros tecidos (YAO et al., 2010). Essa migração, pode estar relacionada com a dinâmica do viroma intestinal dos camarões. Apesar de poucas informações disponíveis, sabe-se que condições ambientais influenciam na população desses organismos (VAN EYNDE et al., 2020) e consequentemente podem influenciar na expressão de genes relacionados à atividade antiviral no hospedeiro. Pois existe uma grande possibilidade de que muitos desses vírus presentes no viroma intestinal sejam patógenos oportunistas, podendo estar latentes em condições ambientais favoráveis, mas podem se tornar virulentos em circunstâncias menos favoráveis, como em ambientes aquícolas (VAN EYNDE et al., 2020).

Nos crustáceos, a Dicer 1 está envolvida não apenas com a defesa antiviral mediada via RNAi, mas também com a maturação de microRNAs (miRNAs), uma categoria de pequenos RNAs não codificantes envolvidos na regulação da expressão de vários genes endógenos. Os miRNAs desempenham papéis importantes na regulação endógena de genes ao nível pós-transcricional e nas respostas antivirais dos crustáceos (HE; JU; ZHANG, 2015). Além disso, mostrou-se ter um importante papel no desenvolvimento de camarões (QUISPE et al., 2016) e de insetos (BIDARI et al., 2022).

Pouco estudos envolvendo o viroma de invertebrados aquáticos são encontrados na literatura. Recentemente em nosso grupo de pesquisa, dados transcritômicos do intestino médio revelaram a presença de um transcrito viral identificado como codificante para uma proteína anotada como “*putative RNA-dependent RNA 43 polymerase*” pertencente ao ribovírus “Wenzhou shrimp vírus 8”, um vírus de RNA não associado a patogenicidade (Bernardo Júnior, 2021). Seria de grande interesse se aprofundar em estudos sobre os mecanismos de defesa contra os vírus presentes no ambiente (mesmo que não patogênicos) e sobre a regulação gênica envolvendo tanto *LvDicer 1* quanto os pré-RNAs e miRNAs em camarões cultivados em BFT.Q. Ademais, conhecer melhor outros grupos de microrganismos compondo a microbiota endobionte de camarões cultivados em sistemas de bioflocos, em especialmente o seu viroma, poderia auxiliar na elucidação destas questões.

Outro resultado aqui obtido foi à expressão majoritária da categoria funcional do sistema da proPO no IM dos animais no sistema BFT.Q. Curiosamente, a expressão do gene codificante para a enzima ativadora da proPO (PPAE 2) foi superior em camarões do BFT.Q

comparado aos em BFT.H, indicando uma possível ativação futura desse sistema de defesa. Em suma, a enzima ativadora da proPO (PPAE) desempenha atividade importante na reação da melanização, responsável por atuar na conversão da proPO em PO, como o próprio nome indica (AMPARYUP; CHAROENSAPSRI; TASSANAKAJON, 2013). Estudos prévios demonstraram que, de fato, os genes da cascata proPO possuem uma expressão elevada no sistema digestório de camarões cultivados em BFT (KIM et al., 2014; PANIGRAHI et al., 2018). Entretanto, como os efetores antimicrobianos dos camarões (PAMs e sistema proPO) são produzidos principalmente nos hemócitos, a elevada expressão desses genes pode ser uma consequência de um significativo número de hemócitos infiltrantes no intestino médio de camarões cultivados em BFT, especialmente no sistema quimioautotrófico. A importância de hemócitos infiltrantes na comunicação entre a imunidade sistêmica e a imunidade àquela relacionada ao intestino em camarões já foi investigada anteriormente (SILVEIRA et al., 2018).

A quantificação absoluta por RT-qPCR é uma metodologia adequada e eficiente para quantificar bactérias intestinais viáveis por meio da expressão de transcritos bacterianos, sendo comumente utilizada em análises com humanos, visando a rápida detecção de infecções bacterianas e a tomada de decisão na escolha de tratamentos para bacterioses intestinais (TSUJI; MATSUDA; NOMOTO, 2018). Com base nesta informação, realizamos a quantificação absoluta de transcritos 16S rRNA bacterianos visando obter informações sobre a abundância e a viabilidade bacteriana no intestino médio dos camarões de alguns dos principais grupos bacterianos ocorrendo em peneídeos. A escolha dos grupos a serem avaliados foi embasada em relatos anteriores de maior ocorrência em peneídeos (*vide* revisão HOLT et al., 2021).

Os grupos bacterianos cuja expressão foi mais abundante no IM dos camarões cultivados em bioflocos (BFT.Q e BFT.H) foram, em ordem decrescente, pertencentes à classe Gammaproteobacteria, filo Bacteroidetes, classe Alphaproteobacteria e filos Firmicutes e Actinobacteria. O perfil de transcrição diferencial do gene 16S rRNA no IM de camarões cultivados nas três condições avaliadas foi: Actinobactéria (BFT.Q > BFT.H > AC), Firmicutes (BFT.H > BFT.Q = AC) e Alphaproteobacteria (BFT.Q > AC = BFT.H). Além destes, avaliamos a abundância de transcritos de *Vibrio* spp., que não apresentou expressão diferencial entre os animais de diferentes condições de cultivo.

Em nosso estudo, o filo Proteobacteria está representado pelas análises de transcritos das suas duas maiores e mais diversas classes: Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria (MADINGA et al., 2016), que juntas apresentaram a maior quantidade de transcritos em todas os IM das condições de cultivos analisadas. Classicamente, o filo Proteobacteria é descrito como sendo o mais abundante no intestino médio de *L. vannamei* (PILOTTO et al., 2018), de

L. stylirostris (CARDONA et al., 2016) e de *Penaeus monodon*, com predomínio em todos os estágios de desenvolvimento dos peneídeos (Holt et al., 2021) podendo ainda estar presente em outros tecidos, como hepatopâncreas (CHEN et al., 2017) e brânquias (ZHANG et al., 2016).

Curiosamente, este filo compreende vários grupos de bactérias Gram-negativas de importância médica e ambiental (MADINGA et al., 2016), capazes de colonizar o trato digestório de vários animais, incluindo peneídeos. A Gammaproteobacteria é a classe mais representativa de Proteobacteria, sendo predominante no intestino de adultos saudáveis, representando cerca de 40% em *L. vannamei* (XIONG et al., 2017). Esta classe, é composta principalmente pelas bactérias *Vibrio* e *Photobacterium* spp. responsáveis por 70% das sequências isoladas dos intestinos de *P. monodon* capturados na natureza e cultivados (HOLT et al., 2021).

Em nosso estudo, *Vibrios* spp., da família Vibrionaceae, representaram em média entre os grupos experimentais 90-97% dos transcritos do filo Gammaproteobacteria presentes no IM dos animais cultivados. Contudo, *Vibrio* spp. são frequentemente descritos como membros dominantes que fazem parte do microbioma intestinal de camarões, onde frequentemente estabelecem um convívio harmônico (HOLT et al., 2021). A capacidade de diversos membros desse grupo em produzir quitinase explica a colonização em tecidos ricos em quitina, como o intestino. Pois, a atividade quitinolítica dos vibrios pode resultar em lesões na carapaça e cutícula intestinal, acarretando na saúde do hospedeiro (SUGITA; ITO, 2006).

O bacterioma intestinal foi recentemente caracterizado em juvenis *L. vannamei* cultivados em BFT e água clara e, após, infectados pelo WSSV (PILOTTO et al., 2018). Nesse trabalho, Vibrionaceae foi a família mais abundante nos animais em água clara quando comparado aos animais cultivados em bioflocos, com 68,23% e 11,35% das comunidades bacterianas totais, respectivamente (PILOTTO et al., 2018). Já, em um estudo realizado por Tapaamorndech e colaboradores (2020), após análise do bacterioma intestinal de *L. vannamei* cultivados em sistema de bioflocos e água clara, o *Vibrio* foi o membro mais dominante no trato gastrointestinal independente do sistema de cultivo. Assim como observado na água desse mesmo cultivo contendo os camarões, onde após análise metagenômica, a riqueza média do gênero *Vibrio* spp foi de 90,22% da população bacteriana total. Além disso, ao nível de espécie, as mais dominantes foram *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. jasicida*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* (TEPAAMORNDECH et al., 2020). Vale ressaltar que a maioria dessas bactérias e outras espécies são relatadas como patogênicas oportunistas para peneídeos como *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. nigripulchritudo*, *V. campbellii*, *Aeromonas* spp. e *Pseudomonas* spp., pertencentes todos à classe

Gammaproteobacteria, *Candidatus Hepatobacter* pertencente à classe Alphaproteobacteria e *Micrococcus* spp. pertencente ao filo Actinobacteria e *Streptococcus* spp. pertencentes ao filo Firmicutes (MORALES-COVARRUBIAS, 2018).

Vale destacar, que algumas bactérias deste filo são responsáveis pela fixação de nitrogênio na água. Ademais, as bactérias nitrificantes são representadas principalmente pelas classes das Gammaproteobacterias (*Nitrococcus* spp), Betaproteobacteria (*Nitrosomonas* spp) e Alphaprotobacteria (*Nitrobacter* spp) (MADINGA et al., 2016). De maneira interessante, pode explicar o aumento de transcritos da classe Alphaprotobacteria, nos IM dos animais no sistema BFT.Q em comparação os animais em sistema de água clara. Já que no sistema BFT.Q, as bactérias do gênero *Nitrobacter* spp, são as principais responsáveis metabolizar o nitrito em nitrato no ambiente aquático, possivelmente influenciando na composição transcrição microbiota dessa classe no intestino desses animais.

Outro filo bastante abundante e majoritariamente de bactérias Gram-negativas são as Bacteriodetes (MADINGA et al., 2016), que são microrganismos dominantes do bacterioplâncton heterotrófico marinho, frequentemente colonizando partículas macroscópicas de matéria orgânica (WOEBKEN et al., 2007). Em nosso estudo, o perfil transcricional de 16S RNA desse grupo não foi afetado pelo tipo de sistema de bioflocos. Apesar da menor abundância transcricional dos filios Actinobacteria e Firmicutes, estes filios foram os únicos que apresentaram expressão diferencial do 16S rRNA associado aos sistemas de cultivo em BFT. O filo Actinobacteria apresentou aumento de transcritos no IM dos camarões em BFT.Q, em relação ao BFT.H e, surpreendentemente, não foi detectado em animais AC (perfil BFT.Q > BFT.H > AC). Esses achados corroboram com relatos recentes sobre a microbiota de *L. vannamei* (PILOTTO et al., 2018; ZHANG et al., 2014), onde a presença desse filo é baixa em BFT e alta em animais cultivados em água clara, podendo apresentar abundância 8 vezes superior no IM aos animais em BFT (PILOTTO et al., 2018). De maneira interessante, este grupo de bactérias abarca algumas das cepas com potencial uso probiótico para a aquicultura e estão associadas a efeitos benéficos à microbiota intestinal do camarão *L. vannamei* (HOLT et al., 2021). Uma vez colonizado o intestino do hospedeiro, as exoenzimas produzidas pelas Actinobacterias podem ser úteis para facilitar a utilização e digestão do alimento. Além disso, a microflora colonizada desempenha um papel importante na resistência a doenças infecciosas, produzindo substâncias antibacterianas (DAS; WARD; BURKE, 2008). São bactérias em sua maioria inofensivas, contudo o gênero *Micrococcus* spp., como sendo relatado como um patógeno oportunista (MORALES-COVARRUBIAS, 2018).

As Firmicutes, são bactérias majoritariamente heterotróficas, utilizam como fonte de energia material orgânico (celulose, amido, açúcares e etc), pelo processo fermentativo (MADINGA et al., 2016). No IM dos camarões cultivados em BFT.H o filo de Firmicutes apresentou a maior abundância relativa de 16S rRNA. Curiosamente, o aumento desse filo no IM de *L. vannamei* foi observado em condições de estresse a amônia (15 mg/L) (DUAN et al., 2021). Em estudo anterior do nosso grupo, foi observado maior abundância de Firmicutes no IM dos animais cultivados em BFT quando comparado aos em água clara. A família Clostridiaceae, pode ter apresentado maior contribuição para esse aumento (PILOTTO et al., 2018), sendo estas bactérias altamente eficientes na fixação de nitrogênio (MADINGA et al., 2016). Uma possível hipótese para o aumento desse grupo nos animais em BFT.H, esteja relacionado ao aumento abrupto da amônia e nitrito no final deste cultivo. Por outro lado, essas bactérias têm enorme potencial para serem utilizadas como probiótico na carcinicultura (EL-SAADONY et al., 2021). As bactérias que compõem esse grupo são majoritariamente benéficas, pois produzem enzimas, como amilase (*Bacillus* spp., *Clostridium* spp.) e proteases (*Staphylococcus* spp., *Bacillus subtilis*) que auxilia na inibição do crescimento de patógenos oportunistas (EL-SAADONY et al., 2021).

2.5 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências que as condições gerais de imunocompetência de camarões juvenis *Litopenaeus vannamei* foi influenciada pelo tipo de sistema de cultivo em bioflocos, a saber, sistema heterotrófico (BFT.H) ou quimioautotótrofico (BFT.Q). Independentemente do sistema, o cultivo em BFT promoveu uma melhor habilidade de reconhecimento e imobilização de microrganismos, evidenciada pela maior capacidade aglutinante na hemolinfa dos camarões. Animais cultivados em BFT.Q apresentaram, em geral, melhores condições de imunocompetência, provavelmente associadas às condições ambientais mais estáveis no cultivo. O perfil transcricional no intestino médio de animais em BFT.Q foi notadamente diferencial para genes relacionados às defesas antivirais (sistema RNAi) e antimicrobianas (sistema proPO; peptídeo antimicrobiano com atividade antifúngica - stylicina). Além disso, animais em BFT tiveram uma maior quantidade de células imunocompetentes circulantes na hemolinfa. Já, o cultivo em BFT.H promoveu um perfil transcricional nos animais mais voltado para defesas antimicrobianas (peptídeo antimicrobiano ALF-A), notadamente contra bactérias e fungos. Embora diferentes grupos bacterianos tenham sido identificados no intestino médio dos camarões, o perfil transcricional

dos principais grupos bacterianos de peneídeos foi diferencial e dependente do tipo de sistema BFT. As bactérias viáveis colonizando o intestino médio dos camarões foram especialmente pertencentes aos filos Actinobacteria (BFT.Q) e Firmicutes (BFT.H), o último associado a picos de compostos nitrogenados no cultivo. Em conjunto, nossos achados fornecem evidências do impacto das condições de cultivo em BFT tanto sobre a imunocompetência dos camarões, como das comunidades bacterianas endobiontes, além de contribuir com novas informações acerca da relação ambiente, imunidade e microbiota, que poderão auxiliar na prevenção de enfermidades nos cultivos.

2.6 REFERÊNCIAS

- AGUILERA-RIVERA, D. et al. Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 1, p. 119–136, fev. 2019.
- ALENTON, R. R. R. et al. A Hint of Primitive Mucosal Immunity in Shrimp through *Marsupenaeus japonicus* Gill C-Type Lectin. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 8, p. 2310–2318, 15 out. 2019.
- AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, abr. 2013.
- ARGENA, N. C. Caracterização molecular e funcional de kammaricinas, uma nova família de peptídeos antimicrobianos de camarões peneídeos. p. 58, 2020.
- ASCHE, F. et al. The economics of shrimp disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, n. August 2019, p. 107397, nov. 2021.
- BACCHETTI DE GREGORIS, T. et al. Improvement of phylum- and class-specific primers for real-time PCR quantification of bacterial taxa. **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 3, p. 351–356, set. 2011.
- BACHÈRE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149–168, 2004.
- BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, p. 169–224, 2014.
- BARTHOLOMAY, L. C. et al. Nucleic-acid based antivirals: Augmenting RNA interference to ‘vaccinate’ *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 261–266, jun. 2012.
- BEČAK, W.; PAULETE, J. Técnicas de citologia e histologia. **Nobel**, 1976.
- BIDARI, F. et al. Targeting the <scp>microRNA</scp> pathway core genes, Dicer 1 and Argonaute 1, negatively affects the survival and fecundity of *Bemisia tabaci*. **Pest Management Science**, v. 78, n. 10, p. 4234–4239, 7 out. 2022.
- BOSSIER, P.; EKASARI, J. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1012–1016, set. 2017.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. Bioestatística: princípios e aplicações. **Artmed**, v. 1, p. 256, 2003.

CANTELLI, L. et al. Dietary supplementation with sulfated polysaccharides from *Gracilaria birdiae* promotes a delayed immunostimulation in marine shrimp challenged by the white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v. 27, n. 2, p. 349–367, 14 abr. 2019.

CARDONA, E. et al. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 933–939, ago. 2015.

CARDONA, E. et al. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 157, 19 dez. 2016.

CHEN, W.-Y. et al. Microbiome Dynamics in a Shrimp Grow-out Pond with Possible Outbreak of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 9395, 24 dez. 2017.

CRAB, R. et al. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. no-no, 9 jul. 2010.

DAS, S.; WARD, L. R.; BURKE, C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 81, n. 3, p. 419–429, 1 dez. 2008.

DAUDA, A. B. Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1193–1210, 22 maio 2020.

DE JESÚS BECERRA-DORAME, M. et al. Effect of using autotrophic and heterotrophic microbial-based-systems for the pre-grown of *Litopenaeus vannamei*, on the production performance and selected haemolymph parameters. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 5, p. 944–948, abr. 2014.

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, abr. 2008.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D. et al. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 371, n. 1695, p. 20150300, 26 maio 2016.

DUAN, Y. et al. Toxic effects of ammonia and thermal stress on the intestinal microbiota and transcriptomic and metabolomic responses of *Litopenaeus vannamei*. **Science of The Total Environment**, v. 754, p. 141867, 1 fev. 2021.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1–4, p. 346–358, jun. 2006.

EKASARI, J. et al. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 332–339, dez. 2014.

EL-SAADONY, M. T. et al. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 117, p. 36–52, out. 2021.

EL-SAYED, A. M. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 676–705, 9 jan. 2021.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: **Water Quality**. [s.l.] InTech, 2017a.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: **Water Quality**. [s.l.] InTech, 2017b.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZO, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In: **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. [s.l.] InTech, 2013.

FAO, 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Rome: FAO, 2022.

FARIAS, N. D. et al. Litopenaeus vannamei stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82–92, 2019.

FERREIRA, G. S. et al. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. **Aquaculture**, v. 533, n. September 2020, 2021.

GONÇALVES, P. et al. Molecular signatures at imminent death: Hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 42, n. 2, p. 294–301, 2014.

GUSTILATOV, M. et al. Protective effects of the biofloc system in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) culture against pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 124, p. 66–73, maio 2022.

HE, Y.; JU, C.; ZHANG, X. Roles of small RNAs in the immune defense mechanisms of crustaceans. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p. 399–403, dez. 2015.

HICKS, S. J. et al. The Role of Mucins in Host–Parasite Interactions. Part I – Protozoan Parasites. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 476–481, nov. 2000.

HOLT, C. C. et al. Understanding the role of the shrimp gut microbiome in health and disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, p. 107387, nov. 2021.

HUSSAIN, A. S. et al. Effects of culturing the Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* in “biofloc” vs “synbiotic” systems on the growth and immune system. **Aquaculture**, v. 542, p. 736905, set. 2021.

IUNES, R. S. et al. Does the heterotrophic system influence the cellular immune response of *Litopenaeus vannamei* shrimp? In vitro phagocytosis indices and superoxide anion production comparisons. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 2, p. 100009, dez. 2021.

- JOHNSON, V. J. M. et al. Lectins in Penaeid Shrimps: Purification, Characterization, and Biological Significance. In: **Aquatic Lectins**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022. p. 125–167.
- KHANJANI, M. H.; ALIZADEH, M.; SHARIFINIA, M. Effects of different carbon sources on water quality, biofloc quality, and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings in a heterotrophic culture system. **Aquaculture International**, v. 29, n. 1, p. 307–321, 9 fev. 2021.
- KIM, S. K. et al. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 362–371, 2014.
- KOOLOTH VALAPPIL, R.; STENTIFORD, G. D.; BASS, D. The rise of the syndrome – sub-optimal growth disorders in farmed shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 1888–1906, 2021.
- KULKARNI, A. et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 431–459, 2021.
- LE MOULLAC, G. et al. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 8, n. 8, p. 621–629, nov. 1998.
- LI, C.-C.; YEH, S.-T.; CHEN, J.-C. Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 28, n. 1, p. 121–127, jan. 2010.
- LIU, G. et al. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. **Fish and Shellfish Immunology**, 2017.
- LIU, H. et al. Pathogen of *Vibrio harveyi* infection and C-type lectin proteins in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 119, n. September, p. 554–562, 2021a.
- LIU, W. et al. Performance of a recirculating aquaculture system using biofloc biofilters with convertible water-treatment efficiencies. **Science of The Total Environment**, 2021b.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- MADINGA, M. T. . et al. *Microbiologia de Brock*. **Artmed**, v. 14, 2016.
- MATOS, G. M. et al. Massive gene expansion and sequence diversification is associated with diverse tissue distribution, regulation and antimicrobial properties of anti-lipopolysaccharide factors in shrimp. **Marine Drugs**, v. 16, n. 10, p. 1–17, 2018.
- MATOS, G. M.; ROSA, R. D. On the silver jubilee of crustacean antimicrobial peptides. **Reviews in Aquaculture**, n. August, p. 1–19, 2021.

- METSALU, T.; VILO, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W566–W570, 1 jul. 2015.
- MORALES-COVARRUBIAS, M. S. Shrimp Bacterial Infections in Latin America: A Review. **Asian Fisheries Science**, v. 31S, 31 dez. 2018.
- MOSS, S. M. et al. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012.
- PANIGRAHI, A. et al. Carbon: Nitrogen (C:N) ratio level variation influences microbial community of the system and growth as well as immunity of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in biofloc based culture system. **Fish and Shellfish Immunology**, 2018.
- PANIGRAHI, A. et al. Bioaugmentation of biofloc system with enzymatic bacterial strains for high health and production performance of *Penaeus indicus*. **Scientific reports**, 2021.
- PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.
- PILOTTO, M. et al. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, n. August 2019, p. 103618, 2020.
- PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the Arthrospira-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. March, p. 47–52, 2019.
- QIU, J. et al. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 36–41, jun. 2011.
- QUISPE, R. L. et al. Transcriptional profiling of immune-related genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during ontogenesis. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 58, p. 103–107, 2016.
- ROLLAND, J. L. et al. Stylicins, a new family of antimicrobial peptides from the Pacific blue shrimp *Litopenaeus stylirostris*. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 6, p. 1269–1277, 2010.
- ROSA, R. D. et al. A hemocyte gene expression signature correlated with predictive capacity of oysters to survive *Vibrio* infections. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 252, 18 dez. 2012.
- ROSA, R. D.; BARRACCO, M. A. Antimicrobial peptides in crustaceans. **Invertebrate Survival Journal**, v. 7, n. 2, p. 262–284, 2010.
- SCHVEITZER, R. et al. Effect of different biofloc levels on microbial activity, water quality and performance of *Litopenaeus vannamei* in a tank system operated with no water exchange.

Aquacultural Engineering, v. 56, p. 59–70, 2014.

SERRA, F. P. et al. Use of different carbon sources for the biofloc system adopted during the nursery and grow-out culture of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture International**, v. 23, n. 6, p. 1325–1339, 11 dez. 2015.

SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.

SODERHALL, K.; HALL, L. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 797, n. 1, p. 99–104, 24 jan. 1984.

SUGITA, H.; ITO, Y. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 336–342, set. 2006.

TEPAAMORNDECH, S. et al. Metagenomics in bioflocs and their effects on gut microbiome and immune responses in Pacific white shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 106, p. 733–741, nov. 2020.

TSUJI, H.; MATSUDA, K.; NOMOTO, K. Counting the Countless: Bacterial Quantification by Targeting rRNA Molecules to Explore the Human Gut Microbiota in Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 29 jun. 2018.

VAN EYNDE, B. et al. Exploration of the virome of the European brown shrimp (*Crangon crangon*). **Journal of General Virology**, v. 101, n. 6, p. 651–666, 1 jun. 2020.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 1–12, 2002.

WOEBKEN, D. et al. Potential Interactions of Particle-Associated Anammox Bacteria with Bacterial and Archaeal Partners in the Namibian Upwelling System. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4648–4657, 15 jul. 2007.

XIONG, J. et al. Integrating gut microbiota immaturity and disease-discriminatory taxa to diagnose the initiation and severity of shrimp disease. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 1490–1501, abr. 2017.

YAO, X. et al. A Dicer-1 gene from white shrimp *Litopenaeus vannamei*: Expression pattern in the processes of immune response and larval development. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 565–570, out. 2010.

ZHANG, L. et al. Effects of ammonia-N exposure on the concentrations of neurotransmitters, hemocyte intracellular signaling pathways and immune responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 75, p. 48–57, abr. 2018.

ZHANG, M. et al. Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp,

Litopenaeus vannamei, fed diets with different lipid sources. **Aquaculture**, v. 434, p. 449–455, out. 2014.

ZHANG, M. et al. Symbiotic Bacteria in Gills and Guts of Chinese Mitten Crab (*Eriocheir sinensis*) Differ from the Free-Living Bacteria in Water. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p. e0148135, 28 jan. 2016.

ZHANG, Y.-X.; ZHANG, M.-L.; WANG, X.-W. C-Type Lectin Maintains the Homeostasis of Intestinal Microbiota and Mediates Biofilm Formation by Intestinal Bacteria in Shrimp. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 206, n. 6, p. 1140–1150, 15 mar. 2021.

ZHAO, M. et al. Effects of ammonia on shrimp physiology and immunity: a review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 4, p. 2194–2211, 18 nov. 2020.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarões Marinhos. Produção brasileira de camarão cultivado por estado: dados reais de 2015. 2016.

AGUILERA-RIVERA, D. et al. Immune response of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, previously reared in biofloc and after an infection assay with *Vibrio harveyi*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 1, p. 119–136, fev. 2019.

ANDERSON, J. L.; ASCHE, F.; GARLOCK, T. Globalization and commoditization: The transformation of the seafood market. **Journal of Commodity Markets**, v. 12, p. 2–8, dez. 2018.

ARTS, J. A. J. et al. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 23, n. 1, p. 164–170, jul. 2007.

ASCHE, F. et al. The economics of shrimp disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, n. August 2019, p. 107397, nov. 2021.

AVNIMELECH, Y. Carbon/nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 176, n. 3–4, p. 227–235, jun. 1999.

AVNIMELECH, Y. **Biofloc Technology - A Practical Guide Book. 3rd ed. The World Aquaculture Society**. Baton Rouge, Louisiana, United States., 2015.

BACHÈRE, E. et al. Insights into the anti-microbial defense of marine invertebrates: the penaeid shrimps and the oyster *Crassostrea gigas*. **Immunological Reviews**, v. 198, p. 149–168, 2004.

BARRACCO, M. A.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. **Guía Técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**, p. 169–224, 2014.

BERNARDO JR, F. F. Identificação de genes candidatos a uma assinatura transcricional no intestino médio de camarões *Litopenaeus vannamei* associada ao cultivo em bioflocos e à infecção pelo vírus da síndrome da mancha branca. p. 64, 2021.

BOSSIER, P.; EKASARI, J. Biofloc technology application in aquaculture to support sustainable development goals. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 1012–1016, set. 2017.

BUCHMANN, K. Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 23 set. 2014.

BURFORD, M. A. et al. Nutrient and microbial dynamics in high-intensity, zero-exchange shrimp ponds in Belize. **Aquaculture**, v. 219, n. 1–4, p. 393–411, abr. 2003.

BURFORD, M. A. et al. The contribution of flocculated material to shrimp (*Litopenaeus vannamei*) nutrition in a high-intensity, zero-exchange system. **Aquaculture**, v. 232, n. 1–4, p. 525–537, abr. 2004.

CAPO, F.; WILSON, A.; DI CARA, F. The Intestine of *Drosophila melanogaster*: An Emerging Versatile Model System to Study Intestinal Epithelial Homeostasis and Host-Microbial Interactions in Humans. **Microorganisms**, v. 7, n. 9, p. 336, 9 set. 2019.

CARDONA, E. et al. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 933–939, ago. 2015.

CNA, C. DA A. E P. DO B. Panorama do Agro - Semana 27 de setembro a 1º de outubro de 2021. **CNA Brasil**, v. ed 29, p. 11, 2021.

CRAB, R. et al. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 5, p. no-no, 9 jul. 2010.

DAUDA, A. B. Biofloc technology: a review on the microbial interactions, operational parameters and implications to disease and health management of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 2, p. 1193–1210, 22 maio 2020.

EBELING, J. M.; TIMMONS, M. B.; BISOGNI, J. J. Engineering analysis of the stoichiometry of photoautotrophic, autotrophic, and heterotrophic removal of ammonia–nitrogen in aquaculture systems. **Aquaculture**, v. 257, n. 1–4, p. 346–358, jun. 2006.

EKASARI, J. et al. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 332–339, dez. 2014.

EL-SAYED, A. M. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: a comprehensive review, with emphasis on the last decade. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 676–705, 9 jan. 2021.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Biofloc Technology (BFT): A Tool for Water Quality Management in Aquaculture. In: **Water Quality**. [s.l.] InTech, 2017.

EMERENCIANO, M. G. C. et al. Intensification of Penaeid Shrimp Culture: An Applied Review of Advances in Production Systems, Nutrition and Breeding. **Animals**, v. 12, n. 3, 2022.

EMERENCIANO, M.; GAXIOLA, G.; CUZO, G. Biofloc Technology (BFT): A Review for Aquaculture Application and Animal Food Industry. In: **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. [s.l.] InTech, 2013.

EPAGRI. Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. **Síntese Informativa da Maricultura**, p. 1–8, 2018.

EPAGRI. Centro de Desenvolvimento em Aquicultura e Pesca. **Cedap**, 2020.

FAO, 2020. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Rome: [s.n.].

FAO, 2022. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2022**. Rome: FAO, 2022.

FAO YEARBOOK ANNUAIRE. **Fishery and Aquaculture Statistics 2019/FAO annuaire Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2019/FAO anuario. Estadísticas de**

pesca y acuicultura 2019. Rome: [s.n.].

FARIAS, N. D. et al. Litopenaeus vannamei stylicins are constitutively produced by hemocytes and intestinal cells and are differentially modulated upon infections. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, p. 82–92, 2019.

FERREIRA, G. S. et al. Heterotrophic, chemoautotrophic and mature approaches in biofloc system for Pacific white shrimp. **Aquaculture**, v. 533, n. September 2020, 2021.

FLEGEL, T. W. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2012.

FLEGEL, T. W. A future vision for disease control in shrimp aquaculture. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 50, n. 2, p. 249–266, 2019.

GAGLIARDI, T. R. Imunidade intestinal em camarões Litopenaeus vannamei: expressão gênica espacial e o efeito da via de infecção pelo WSSV. p. 105, 2020.

GUSTILATOV, M. et al. Protective effects of the biofloc system in Pacific white shrimp (Penaeus vannamei) culture against pathogenic Vibrio parahaemolyticus infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 124, p. 66–73, maio 2022.

HICKS, S. J. et al. The Role of Mucins in Host–Parasite Interactions. Part I – Protozoan Parasites. **Parasitology Today**, v. 16, n. 11, p. 476–481, nov. 2000.

IBGE. No Produção da Pecuária Municipal 2018 PPM. 2018.

IUNES, R. S. et al. Does the heterotrophic system influence the cellular immune response of Litopenaeus vannamei shrimp? In vitro phagocytosis indices and superoxide anion production comparisons. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, v. 2, p. 100009, dez. 2021.

JUNNING CAI et al. Top 10 species groups in global aquaculture 2019. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, p. 2019–2022, 2021.

KIM, S. K. et al. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei postlarvae. **Aquaculture Research**, v. 45, n. 2, p. 362–371, 2014.

KONDO, H. et al. Draft genome sequence of non-Vibrio parahaemolyticus acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. **Genome Announcements**, v. 3, n. 5, p. 2014–2015, 2015.

KOOLOTH VALAPPIL, R.; STENTIFORD, G. D.; BASS, D. The rise of the syndrome – sub-optimal growth disorders in farmed shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 4, p. 1888–1906, 2021.

KOU, G. et al. Tissue distribution of white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp and crabs. **Proceedings to the Special Session on Shrimp Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology**, p. 267–271, 1998.

KULKARNI, A. et al. Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special

reference to shrimp. **Reviews in Aquaculture**, v. 13, n. 1, p. 431–459, 2021.

KUMAR, V. et al. Biofloc-Based Enhanced Survival of *Litopenaeus vannamei* Upon AHPND-Causing *Vibrio parahaemolyticus* Challenge Is Partially Mediated by Reduced Expression of Its Virulence Genes. **Frontiers in Microbiology**, 2020.

LEE, C. et al. Supplemental effects of biofloc powder on growth performance, innate immunity, and disease resistance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fisheries and Aquatic Science**, 2017.

LEE, H.-Y. et al. The role of commensal microbes in the lifespan of *Drosophila melanogaster*. **Aging**, v. 11, n. 13, p. 4611–4640, 12 jul. 2019.

LEE, S. Y.; SÖDERHÄLL, K. Characterization of a Pattern Recognition Protein, a Masquerade-Like Protein, in the Freshwater Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7319–7326, 15 jun. 2001.

LIAO, X.; HE, J.; LI, C. Decapod iridescent virus 1: An emerging viral pathogen in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, 8 mar. 2022.

LIGHTNER, D. V. et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 174–183, 2012.

LO, C. F.; KOU, G. H. Virus-associated white spot syndrome of shrimp in Taiwan: A review. **Fish Pathology**, v. 33, n. 4, p. 365–371, 1998.

MARTINS, M. A. et al. Heterotrophic and mature biofloc systems in the integrated culture of Pacific white shrimp and Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 514, n. August 2019, p. 734517, 2020.

MATTHEW BRIGGS, SIMON FUNGE-SMITH, R. S. AND M. P. Introduction and movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. **FAO**, 2004.

MCGAW, I. J.; CURTIS, D. L. Effect of meal size and body size on specific dynamic action and gastric processing in decapod crustaceans. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 166, n. 3, p. 414–425, 2013.

MIRANDA-BAEZA, A. et al. Short-term effect of the inoculation of probiotics in mature bioflocs: Water quality parameters and abundance of heterotrophic and ammonia-oxidizing bacteria. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 1, p. 255–264, 2020.

MOSS, S. M. et al. The role of selective breeding and biosecurity in the prevention of disease in penaeid shrimp aquaculture. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 247–250, 2012.

NUNES, A. J. P.; FEIJÓ, R. G. Convivência com o vírus da mancha branca no cultivo de camarão marinho no Brasil. **Revista da Associação Brasileira de Criadores de Camarão**, v. 2, p. 30–36, 2016.

OIE. Acute hepatopancreatic necrosis disease. **Oie**, p. 1–12, 2019.

- PANIGRAHI, A. et al. Bioaugmentation of biofloc system with enzymatic bacterial strains for high health and production performance of *Penaeus indicus*. **Scientific reports**, 2021.
- PILOTTO, M. et al. Exploring the Impact of the Biofloc Rearing System and an Oral WSSV Challenge on the Intestinal Bacteriome of *Litopenaeus vannamei*. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 83, 2018.
- PILOTTO, M. et al. Environmental rearing conditions are key determinants of changes in immune gene expression patterns in shrimp midgut. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 106, n. August 2019, p. 103618, 2020.
- PILOTTO, M. R. et al. Potential immunomodulatory and protective effects of the *Arthrospira*-based dietary supplement on shrimp intestinal immune defenses. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 88, n. March, p. 47–52, 2019.
- PROMTHALE, P. et al. Bioflocs substituted fishmeal feed stimulates immune response and protects shrimp from *Vibrio parahaemolyticus* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, 2019.
- RESTREPO, L. et al. Draft genome sequence of pathogenic bacteria *Vibrio parahaemolyticus* strain Ba94C2, associated with acute hepatopancreatic necrosis disease isolate from South America. **Genomics Data**, v. 9, p. 143–144, set. 2016.
- SILVEIRA, A. S. et al. An immune-related gene expression atlas of the shrimp digestive system in response to two major pathogens brings insights into the involvement of hemocytes in gut immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 79, p. 44–50, 2018.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Expression of immune-related genes in the digestive organ of shrimp, *Penaeus monodon*, after an oral infection by *Vibrio harveyi*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 1, p. 19–28, 2010.
- SOONTHORNCHAI, W. et al. Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of *penaeus monodon*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–18, 2015.
- STENTIFORD, G. D. et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 110, n. 2, p. 141–157, jun. 2012.
- TANG, K. F. J. et al. **Shrimp acute hepatopancreatic necrosis disease strategy manual**. [s.l.]
- TRAN, L. et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 105, n. 1, p. 45–55, 2013.
- WANG, L. et al. Structure and partial protein profiles of the peritrophic membrane (PM) from the gut of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 6, p. 1285–1291, 2012.

ANEXOS

Quadro 1. Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão

Sigla	Nome do genes	Nº GenBank	Sequência (5' - 3')	Produto de amplificação (pb)	Referência
Genes de Referência					
<i>Lv</i> EF1 α	Elongation factor 1-alpha	GU136229	Fw- TGGCTGTGAACAAGATGGACA Rw- TTGTAGCCACCTTCTTGACG	103	De la Vega et al., 2008
<i>Lv</i> RpS3A	S3A ribosomal protein	BF023924	Fw- GGCTTGCTATGGTGTGCTCC Rw- TCATGCTCTTGGCTCGCTG	101	De la Vega et al., 2008
<i>Lv</i> Actin	β -actin	AF300705	Fw- CCACGAGACCACCTACAAC Rw- AGCGAGGGCAGTGATTC	142	Wang et al., 2007
Pepetídeos antimicrobianos (AMPs)					
<i>Litvan</i> PEN1/2	Penaeidin 1/2	Y14925	Fw- GTCTGCCTGGTCTTCTTGG Rw- GCAGCAATTGCGAGCATCTG	168	Goncalves et al., 2014
<i>Litvan</i> PEN3	Penaeidin 3	AF390144	Fw- GTCTGCCTGGTCTTCTTGG Rw- GCGCTTGTGAGAAGGAAATTC	178	Goncalves et al., 2014
<i>Litvan</i> PEN4	Penaeidin 4	DQ211701	Fw- GTCTGCCTGGTCTTCTTGG Rw- TTGCGGAGGGAATCCGTAG	321	Goncalves et al., 2014
<i>Litvan</i> ALF-A	ALF Group A	EW713395	Fw- CTGATTGCTCTTGTGCCACG Rw- TGACCCATGAACCTCCACCTC	113	Rosa et al., 2013
<i>Litvan</i> ALF-B	ALF Group B	GQ227486	Fw- GTGTCTCCGTGTTGACAAGC Rw- ACAGCCAACGATCTTGCTG	123	Rosa et al., 2013
<i>Litvan</i> ALF-C	ALF Group C	FE058235	Fw- ATGCGAGTGTCTGCTCAG Rw- TGAGTTTGTTCGCGATGGCC	115	Rosa et al., 2013
<i>Litvan</i> ALF-E	ALF Group E	FE069658	Fw- TGCTACGTGAATCGCAGTCC Rw- CGCTTCTCTCCGACAATG	100	Matos et al., 2018
<i>Litvan</i> ALF-F	ALF Group F	KJ000049	Fw- AAGCTCTCATTCTGGTCGG Rw- GGGTGTAAAGGATACGTGC	180	Matos et al., 2018
<i>Litvan</i> ALF-G	ALF Group G	FE153496	Fw- CCGCTGCATGTCAAGTATCC Rw- TCAGCAGTAGCAGTGTCCAGC	140	Matos et al., 2018
<i>Carcinin Lv</i> 1	<i>Carcinin Lv</i> 1 (Grupo 1 Type I Crustin)	FE175664	Fw- CCTCCCGTTGAAGATCACAG Rw- ATGATGGTCCAAGCAGGTGTC	144	Vieira, 2016
<i>Carcinin Lv</i> 2	<i>Carcinin Lv</i> 2 (Grupo 1 Type I Crustin)	FE099583	Fw- CTGTTAAGATCCTTGAGCCG Rw- CCTCTCACGTGTTTTCAATAG	126	Vieira, 2016
<i>Litvan</i> KAM1	Kammaricin 1 (short form)	GFRP01009775	Fw- GATGTTCCCTGGCGGTGGTC Rw- GTCCACCGTATTGCTCTACA	134	Argenta, 2020
<i>Lvan</i> - Stylicin1	Stylicin 1	MH108957	Fw- CACAAGAGTGCCACCCGCTG Rw- ACATTGCGAGTTATGGTAGCC	125	Goncalves et al., 2014
<i>Lvan</i> - Stylicin2	Stylicin 2	MH108958	Fw- CACAAGAGTGCCACCCGCTG Rw- CACACAGGCTGCCACATAA	151	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> ALF-3cys	ALF-like with 3 cysteine residues	XM_027362708	Fw- GTGTTTCATATCACTGGTCGG Rw- ATAAGGCATCCAGTCCCTTCG	174	Matos, 2022
<i>Lv</i> ALF-4cys	ALF-like with 4 cysteine residues	XM_027358404	Fw- TTGCTCGGCATCTTCTGGG Rw- CACAGGTGAAAGTGCCTGG	126	Matos, 2022
Via de sinalização celular					
<i>Lv</i> Toll 2	Toll receptor 2	JN180637	Fw- CATGCCTGCAGGACTGTTTA Rw- GGCTTGAGGGTAAGGTCTTC	158	Wang et al., 2012
<i>Lv</i> Toll 3	Toll receptor 3	JN180638	Fw- TCGTACAACCAGCTGACGAG Rw- ATACTTCAGGTGGGCCACAG	195	Wang et al., 2012
<i>Lv</i> Toll 4	Toll receptor 4	KT372179	Fw- CTTGCTGACTGGGCATTTGG Rw- TGGCTAGTCGTAATCCCGC	127	Li et al., 2018
<i>Lv</i> TRAF6	Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6 (TRAF6)	HM581680	Fw- GTCCGCTCTTAAGTCACTG Rw- CTCATTCCGTTAGCTGAGC	178	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> IMD	Immune deficiency (Imd)	FJ592176	Fw- AAGGTGCGAGGTGAGTCTGG Rw- GATCATCTGGGTGAGTCTGG	192	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> Dorsal	Dorsal (Rel/NF- κ B transcription factor)	FJ998202	Fw- TCACTGTTGACCCACCTTAC Rw- GAGGGCATCTCAACATCAC	164	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)	HQ228176	Fw- CATGGCTCTGGCAGATAAGC Rw- GCATCTGCTGGTCTCTTTC	107	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> JAK	Janus Kinase (JAK)	KP310054	Fw- TGCTGTCCGACTGCGTTTC Rw- GAATTTCTGTTGGCGTGAAG	117	Song et al., 2015
<i>Lv</i> DOME	JAK/STAT pathway receptor Domeless	KC346866	Fw- CTCAGGCTATGTTTCTCAGGATTCA Rw- CACGGCAGTTCCTTATGGTCT	147	Yan et al., 2015
<i>Lv</i> Relish	Relish (Rel/NF- κ B transcription factor)	EF432734	Fw- CTACATTCTGCCCTTGACTCTGG Rw- GGCTGGCAAGTCTGTTCTCG	124	Hou et al., 2014
<i>Lv</i> HMGBa	High-mobility group (HMGBa)	HQ228174	Fw- GGATGAGAAGGTCAAGTACG Rw- TCCTCGTCGTCTCTCTCTC	186	Goncalves et al., 2014
Proteínas de reconhecimento de padrões moleculares (PRPs)					
<i>Lv</i> LGBP	Lipopolysaccharide (LGBP)	EU102286	Fw- ACCGCAGCATCAGTTATAACC Rw- GTCATCGCCCTCCAGTTG	77	Wang et al., 2007
<i>Lv</i> Gal	Galectin	KF179103	Fw- AATGCTTTACACGAGCAGC Rw- GTCTTCAATCCAGACACAGG	237	Silveira, 2016
<i>Lv</i> Lec	C-type lectin	EF583939	Fw- ACAGGTCTTGTGACACTTC Rw- TGTCTTGCCAAGTGTAGGTG	187	Zhang et al., 2009
<i>Lv</i> CTL3	C-type lectin 3	KF156943	Fw- ATGTTCTTCGTGCTCTGCTGT Rw- GCAGTGGTCGTAATGTTGTG	120	Liu et al., 2014
<i>Lv</i> Dscam	Down syndrome cell adhesion molecule	GQ154653	Fw- AGGTGGACAATCCGTGGTG Rw- GGAGTGTATGTGTGACTGTG	160	Goncalves et al., 2014

Quadro 1. Sequência dos iniciadores referentes aos genes utilizados nas análises de expressão gênica (continuação)

Defesa antiviral						
<i>Lv</i> Der1	Dicer-1	EU676241	Fw- Rw-	CCGGAGATAGAACGGTTCAGTG CGATAATTCCTCCAACACCTG	176	Yao et al., 2010
<i>Lv</i> Der2	Dicer-2	HQ541163	Fw- Rw-	AGGAAATGCAATGTCGTGGTT ACGAGCCCTCCCCTAGATT	78	Chen et al., 2011
<i>Lv</i> Ago1	Argonaute 1	HM234689	Fw- Rw-	TGCGTCATTGGCCATCCAT GCCATCTGGAGCGGAGAAG	65	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Ago2	Argonaute 2	HM234690	Fw- Rw-	GATGGCATGAAGTCTGCAGTTG TGCGCACGACCATCACTAAG	62	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Sid1	Sid-1	HM234688	Fw- Rw-	GAAGCGATTGGCAGTCTATGAAC TGGAAAGCCTATCTGCAACTTG	63	Labreuche et al., 2010
<i>Lv</i> Ars2	Arsenite-resistance protein 2-like protein (Ars2)	HQ692888	Fw- Rw-	GCCATTTATTTGGGAGAGGAC CTGTAACCTCACTGTTCCTCTGAC	115	Chen et al., 2012
Sistema de Ativação da ProPO						
<i>Lv</i> proPO1	Prophenoloxidase 1 (proPO-1)	EU284136	Fw- Rw-	CGGTGACAAAGTTCCTCTTC GCAGGTCGCCGTAGTAAG	122	Wang et al., 2007
<i>Lv</i> proPO2	Prophenoloxidase 2 (proPO-2)	EU373096	Fw- Rw-	GCGGAATGACTTTGGTCTCG AAGTGACGTCATCGGAGAGG	137	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> PPAE2	Prophenoloxidase-activating enzyme 2 (PPAE2)	FE090793	Fw- Rw-	TCAGCAGGATTTGTGTGCC GTCTCAGTGAAGCCCCATC	107	Goncalves et al., 2014
Defesa antioxidante						
<i>Lv</i> GST	Glutathione S-transferase (GST mu-class)	AY573381	Fw- Rw-	CACCTACGAACACTACGAAC GGTTCCTGAAGCCGTCGAG	194	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> CAT	Catalase (CAT)	AY518322	Fw- Rw-	CATCCTTCATTACACGCAG CTTGATGCCTTGGTCCGTC	245	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> GPx	Glutathione peroxidase (GPx)	AY973252	Fw- Rw-	AGAGTTCCGGCACAAGCTG TCGGTAGTGTCTCCTGGTG	72	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> DUOX 2	Duol oxidase 2 (DUOX2)	HAAW01014722	Fw- Rw-	TCCGCAATCTACATGGACG ATGTTCTCTTGTCCGGCTGC	258	Xue et al., 2013
<i>Lv</i> PRDX	Peroxiredoxin (PRDX)	GQ995702	Fw- Rw-	ACGGACAGTTCAAGGAGATC GAATTCCTCAACACGGTCAG	131	Goncalves et al., 2014
Homeostasia						
<i>Lv</i> Clot	Hemolymph clottable protein	DQ984182	Fw- Rw-	ACCAAGGTCGTCTCATTAC TGTCCTTCCAGGGTGTC	172	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> TGI	Transglutaminase I	EF081004	Fw- Rw-	GAGCTTCAAGATCGAGGATCGA GCTGGTTCGTAGCGTTATC	79	Yeh et al., 2009
<i>Lv</i> TGII	Transglutaminase II	EU164849	Fw- Rw-	CCCCGAGGACAGGGAAA GCGGTGGTCAGTGAATCCA	75	Yeh et al., 2013
Citocinas						
<i>Lv</i> SVC1	Single von Willebrand factor type C domain protein 1 (SVC1)	HQ541158	Fw- Rw-	TGCCAACCTAGCTGAGCTTCA CCATCAGGGCACACGTATTTG	81	Chen et al., 2011
<i>Lv</i> IRF	Interferon regulatory factor (IRF)	KM277954	Fw- Rw-	ACGCTGCCCTCTTTCGCTAC ACGCTGTGAACCTGAAGTATCG	162	Rosa et al., 2013
Inibidores de proteases						
<i>Lv</i> α 2M-2	Alpha2-macroglobulin (Banco LIAA = α 2M-2)	DQ988330	Fw- Rw-	TGCAGGTTCTAGTGTGGTAC CACCCAGGTAGTCGATGAC	261	Goncalves et al., 2014
<i>Lv</i> Serpin 7	Serine proteinase inhibitor 7 (Serpin type)	FE082181	Fw- Rw-	GCAACAACGCCTATACCTTC TCTCTGAAGTTGACCCCTCTC	118	Liu et al., 2015

Quadro 2. Pares de base das sequências inseridas nos plasmídeos (insertos) e do vetor correspondente para cada grupo bacteriano analisado.

Grupos Bacterianos	Vetor (pb)	Inserto (pb)	Total (pb)	GenBank
α -proteobacteria	3929	1358	5287	NR_117256
γ -proteobacteria	3929	1916	5845	NR_119060
Bacteroidetes	3929	1375	5304	CP010274
Firmicutes	3929	1410	5339	NR_025922
Actinobacteria	3929	1396	5325	AB027536
<i>Vibrio</i> spp.	3929	1916	5845	NR_119060