

Delano Dias Schleder

**Algas pardas como aditivo alimentar na dieta do
camarão-branco-do-pacífico**

Tese submetida ao curso de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de doutor.

Orientador: Edegar Roberto Andreatta

Orientadora: Leila Hayashi

Florianópolis,
2017

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

Schleder, Delano Dias

Algas pardas como aditivo alimentar na dieta do camarão-branco-do-pacífico / Delano Dias Schleder ; orientador, Edegar Roberto Andreatta, coorientadora, Leila Hayashi, 2017.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Litopenaeus vannamei. 3. Algas pardas. 4. Resistência ao choque térmico. 5. Resistência ao WSSV. I. Andreatta, Edegar Roberto . II. Hayashi, Leila . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

**Uso de algas pardas como aditivo alimentar na dieta do camarão
branco do Pacifico**

Por

DELANO DIAS SCHLEDER

Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de

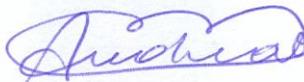
DOUTOR EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

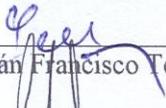


Prof. Alex Pires de Oliveira Nuijer, Dr
Coordenador do Programa
de PG em Aquicultura
Portaria 1938/GR/2012

Banca Examinadora:

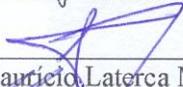


Dr. Edeimar Roberto Andreatta – Orientador

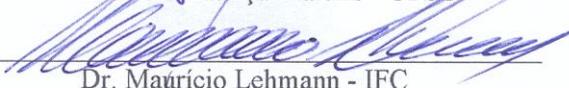


Dr. Hernán Francisco Terenzi - UFSC

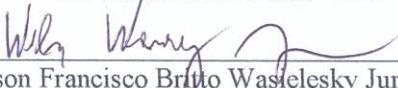
Dr. José Luiz Pedreira Mourião - UFSC



Dr. Maurício Laterça Martins - UFSC



Dr. Maurício Lehmann - IFC



Dr. Wilson Francisco Brito Wasielesky Junior - FURG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao Instituto Federal Catarinense – campus Araquari por permitir meu afastamento integral das minhas atividades de docente a partir do segundo ano de doutorado e por disponibilizar a estrutura e materiais para execução das infecções experimentais.

Tenho muito a agradecer ao pessoal da Pós-Graduação em Aquicultura, Carlito, Val, Jeff, Prof. Dr. Alex Pires e Profa. Dra. Leila Hayashi pelo profissionalismo e competência, e por todo apoio dado desde o mestrado.

Devo múltiplos agradecimentos à Profa. Dra. Débora Machado Fracalossi e sua equipe de técnicos e orientados da Fábrica de Rações e do LABNUTRI/UFSC, Allan, Lula, Maria Fernanda, Renata e Jeferson pela imprescindível contribuição na formulação, produção e análise das rações experimentais.

Sou muito grato também ao Prof. Dr. Vinícius R. Cerqueira e ao técnico Caio Magnotti por disponibilizar a peletizadora para produção das rações do último experimento.

Ao Prof. Dr. Carlos Peres Silva por gentilmente fornecer os materiais e as condições para realização das atividades enzimáticas, e por disponibilizar seu tempo e profundo conhecimento para interpretação dos dados e sanar as minhas dúvidas, sempre com sua admirável habilidade de simplificar um assunto tão complexo. Também sou muito grato a sua orientada Cristina Rios, por toda ajuda, colaboração, amizade e por ser uma pessoa de um coração gigante.

Ao Prof Dr. Marcelo Maraschin e à Dr. Fernanda Ramlov por me guiar no obscuro “mundo da bioquímica das algas” e por todo apoio nas técnicas realizadas. Foi um período de muito aprendizado, muito obrigado Prof Dr. Marcelo Maraschin por compartilhar seu vasto conhecimento.

Tenho muito a agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Edegar R. Andreatta “enciclopédia viva dos camarões”, pelas boas ideias e contribuições, e também a minha co-orientadora, Profa. Dra. Leila Hayashi, por me apresentar e me guiar no mundo das macroalgas (sabe tudo de algas!!), e por suas imensas contribuições no trabalho, desde a execução até a escrita.

Ao pessoal do Lab. de Macroalgas do LCM, Fabio, Pontinha, Débora e Felipe, por todo apoio nas coletas, processamento das algas e tudo mais.

Ao amigo Luiz Rodrigo Mota Vicente da Epagri por fornecer os camarões para inóculo experimental de WSSV.

Ao amigo Dr. Felipe do Nascimento Vieira, pela amizade e pela importante colaboração com os experimentos e durante os anos de atividades no laboratório. Ao amigo Prof. Dr. Walter Q. Seiffert por todo apoio dispendido ao longo dos experimentos. Sou profundamente grato também aos demais integrantes da fantástica equipe de servidores do LCM, João, Seu Chico, Carlos (manutenção), Carlos (biólogo), Davi, Ilsinho, Dimas, Diego, Déia, Claudinha, Fernando e os seguranças Carlos, Mari, Arnildo e Altino que além de contribuir imensamente nas atividades dos experimentos e do dia-a-dia, se tornaram partes importantes da minha passagem pelo LCM, excelentes amigos!

Aos amigos do LCM que contribuíram diretamente no trabalho, Guilherme (meu filho!rs!), Moisés, Ariane, Tamiris, Karol e Ju, fica aqui meu profundo agradecimento pelo esforço, apoio, suor e energia gastos durante as várias etapas do trabalho!! Muito obrigado aos amigos Norha, Mari, Esmeralda, Fernanda (Pará), Fernanda (mineira), Fernanda (do oéstê), Nicole, Iza, Joaquim, Gabi Soltes, Jô, Marysol, Leo, Hortência, Lucas, Júlia e o grande Marco (o showman!) pela amizade e apoio nas coletas, povoamentos e demais atividades. Vou ficar com saudades de todos, e especialmente dos eventos da Micro.

Um agradecimento especial à amiga Dra. Martina Blank, técnica do CEBIME/UFSC, que “quebrou tudo” nas análises de MALDI-TOF, muito obrigado pelo esforço, horas despendidas na padronização das técnicas, nas inúmeras análises, e nas cansativas horas de interpretação de resultados. Sou profundamente grato! Sou grato também às demais técnicas do CEBIME, Vanessa e Elis por todo apoio.

Gostaria de agradecer à Alltech pela premiação regional da América Latina no *Alltech Young Scientist Competition* e por proporcionar uma semana de muito aprendizado pessoal e profissional na competição mundial e no evento ONE17.

E claro, quero agradecer a toda minha família, primos, primas, tios e tias por todo apoio, torcida, orações e amor. Um agradecimento especial a minha mãe Eloty, minha irmã Maristel, meu irmão Jeferson e minha afilhadinha Joaninha. Agradeço também a minha namorada Tanisi por todo apoio e paciência, devido a minha ausência e distância durante os experimentos e demais atividades em Florianópolis, nas viagens à Congressos, pelas horas que fiquei no computador, imerso nos artigos, resumos, apresentações, tese e..., obrigado por todo apoio meu amor!

RESUMO

O objetivo desta tese foi avaliar o uso da biomassa seca das algas pardas *Sargassum filipendula* (S) e *Undaria pinnatifida* (U) como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico. Foram realizados 4 experimentos, no primeiro foram avaliados os parâmetros hemato-imunológicos, microbiologia do intestino e a resistência dos camarões ao choque térmico, após 15 dias de alimentação com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de cada alga parda. No segundo experimento foi utilizada a análise de espectrometria de massa MALDI-TOF para compreender os mecanismos responsáveis pela resistência dos animais alimentados com 0,5% de *S. filipendula* frente ao choque térmico. No terceiro, avaliou-se o desempenho zootécnico, histologia do intestino, atividade de enzimas digestivas e a resistência dos camarões alimentados com os diferentes níveis das algas e desafiados com Vírus da Mancha Branca (WSSV). Por fim, no quarto experimento, o efeito combinado de ambas espécies de algas pardas foi avaliado sobre a resistência ao choque térmico e ao desafio com WSSV. De forma geral, camarões do tratamento 4U apresentaram melhora nos parâmetros imunes, aumento da atividade da lipase e amilase, redução da contagem de *Vibrio* spp. no intestino e maior resistência ao WSSV. Os animais dos tratamentos 0,5S e 2S apresentaram maior sobrevivência após o choque térmico, já os níveis crescentes de *U. pinnatifida* reduziram a sobrevivência. Embora a adição das algas tenha aumentado a área de superfície de absorção do intestino (0,5S e 0,5U) e incrementado a atividade da amilase (0,5S, 2S, 4S e 4U), não foi observada diferença significativa no desempenho zootécnico. A combinação das algas pardas incrementou a resistência dos animais contra ambas condições avaliadas, especialmente ao desafio. Em conclusão, as algas pardas causaram diversos efeitos fisiológicos benéficos aos camarões, sendo mais importante a melhora na resposta contra o WSSV, bem como à variação térmica, que constitui um importante gatilho para surtos de enfermidades.

Palavras-chaves: Aquicultura, *Litopenaeus vannamei*, Algas pardas, Resistência ao choque térmico, Resistência ao WSSV.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to evaluate the effect of brown seaweeds *Sargassum filipendula* (S) and *Undaria pinnatifida* (U) dry biomass as feed additive to Pacific white shrimp. Four experiments were performed. In the first, shrimp hemato-immunological parameters, gut microbiology and thermal shock resistance were evaluated after 15 days of feeding diets containing 0.5, 2 and 4% of each seaweed. In second experiment, MALDI-TOF analysis of shrimp hemocytes was performed as attempt to understand the thermal shock resistance caused by 0.5% of *S. filipendula*. The third experiment consisted in assess growth performance, gut histology, digestive enzymes activity and resistance to White Spot Syndrome Virus (WSSV) challenge of shrimp fed the same diets from first experiment. In the last experiment, the synergistic effect of both brown seaweeds on shrimp resistance to thermal shock and WSSV challenge were evaluated. In general, shrimp from 4U treatment improved amylase and lipase activity and the hemato-immunological parameters, they also showed lower *Vibrio* spp. count in the gut and higher resistance to WSSV. Animals from 0.5S and 2S showed higher survival after thermal shock, whereas, increasing levels of *U. pinnatifida* decreased the survival. Despite seaweed addition had increased gut absorption surface (0.5S and 0.5U) and amylase activity (0.5S, 2S, 4S and 4U), no significant differences were identified in growth performance parameters. Seaweed showed synergistic effect against both evaluated conditions, especially to WSSV challenge. In conclusion, brown seaweeds caused several beneficial effects on shrimp physiology. Most importantly, they improved shrimp response to WSSV infection and its triggering mechanism, such as thermal variation.

Keywords: Aquaculture, *Litopenaeus vannamei*, Brown seaweeds, Thermal shock resistance, WSSV challenge resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 2

Fig. 1 Contagem de bactérias do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação. As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey (P<0,05).....42

Fig. 2 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação, durante 48 h após choque térmico (hact). Houve diferença (P = 0,0001) na mortalidade entre 0,5S e 2S e os demais tratamentos. Não houveram diferenças significativas (P > 0,09) entre 4S, 0,5U, 2U e controle. O tratamento 4U apresentou mortalidade significativamente maior (P < 0,0001) do que os demais tratamentos.....44

Capítulo 3

Fig. 1. (a) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de lipídeos do sobrenadante do lisado de hemócitos do camarão-branco-do-pacífico alimentado com dieta controle, sem suplementação, antes e 15 min depois do choque térmico (C e C-CT, respectivamente), e com dietas contendo 0,5% de *Sargassum filipendula*, antes e 15 min depois do choque térmico (0,5S e 0,5S-CT, respectivamente); (b) Diagrama da análise dos componentes principais dos perfis de lipídeos do sobrenadante do lisado de hemócitos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT)..... 68

Fig. 2. (a) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de proteínas dos hemócitos intactos do camarão-branco-do-pacífico alimentado com dieta controle, sem suplementação, antes e 15 min depois do choque térmico (C e C-CT, respectivamente), e com dietas contendo 0,5% de *Sargassum filipendula*, antes e 15 min depois do choque térmico (0,5S e 0,5S-CT, respectivamente); (b) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de proteínas do sobrenadante do lisado de hemócitos dos mesmos quatro tratamentos; (c) Diagrama da análise dos componentes principais dos perfis de proteínas dos hemócitos intactos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT); (d) Diagrama da análise dos componentes principais

dos perfis de proteínas do sobrenadante do lisado de hemócitos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT)..... 70

Fig. 3. Espectro de MALDI-TOF MS/MS da m/z 716,5, demonstrando fragmentos típicos utilizados para identificação como uma fosfatidilcolina PC 29:0 (10:0/19:0) com sódio..... 65

Fig. 4. Espectro de MALDI-TOF MS/MS da m/z 666,5, demonstrando fragmentos típicos utilizados para identificação como uma lisofosfatidilcolina LPC 27:3 com sódio. 66

Capítulo 4

Fig. 1. Fotomicrografia do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (B, D e F, respectivamente), 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida*, (C, E e G, respectivamente) e dieta controle, sem suplementação (A). 90

Fig. 2. Mortalidade cumulativa de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e dieta controle (sem adição) após 72 horas pós-infecção (h.p.i.) com vírus da Mancha Branca. Houve diferença significativa na mortalidade do tratamentos 4U ($p=0,043$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença ($p>0,15$) entre os demais tratamentos e o grupo controle. 93

Capítulo 5

Fig. 1 Esquema do delineamento experimental, considerando choque térmico, desafio com WSSV e coletas para as análises de MALDI-TOF MS. 107

Fig. 2 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* (S) e *Undaria pinnatifida* (U) respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, 24 horas pós choque térmico (h.p.c.t.). Não houve diferença significativa ($p>0,09$) entre todos os tratamentos. 111

Fig. 3 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* (S) e *Undaria pinnatifida* (U) respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, em 96 horas pós-infecção (h.p.i.) com WSSV. Houve diferença significativa (*) na mortalidade dos tratamentos 0,5S:2U ($p=0,0001$) e 0,5S:4U ($p=0,0006$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença ($p>0,09$) entre o tratamento 0,5S:1U e o grupo controle.... 112

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1** Composição bioquímica e centesimal das algas secas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*. 36
- Tabela 2** Formulação e composição centesimal das dietas experimentais. 38
- Tabela 3** Parâmetros hemato-imunológicos de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação. 43

Capítulo 3

- Tabela 1** Formulação e composição centesimal das dietas experimentais. 57
- Tabela 2** Dados do MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados nas amostras de sobrenadante de hemócitos lisados de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com a dieta controle e com 0,5% de *S. filipendula*, antes (C – controle; 0,5S – 0,5% *S. filipendula*) e após (C-CT - controle; 0,5S-CT – 0,5% *S. filipendula*) o choque térmico. Dados apresentados como a razão entre a intensidade do sinal após e antes o choque térmico (C-TS:C e 0,5S-TS:0,5S). 64
- Tabela 3** Dados do MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas com alto nível de significância ($p \leq 0.01$) nas amostras de hemócitos intactos e sobrenadante de hemócitos lisados de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com a dieta controle e com 0,5% de *S. filipendula*, antes (C – controle; 0,5S – 0,5% *S. filipendula*) e após (C-TS – controle; 0,5S-TS – 0,5% *S. filipendula*) o choque térmico. Dados apresentados como a razão entre a intensidade do sinal após e antes o choque térmico (C-TS:C e 0,5S-TS:0,5S). 67

Capítulo 4

- Tabela 1** Formulação e composição centesimal das dietas experimentais. 82
- Tabela 2** Desempenho zootécnico de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida*. 88

Tabela 3 Razão do perímetro interno (PI) de epitélio de absorção e do perímetro externo (PE) do intestino médio em micrômetros de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (U).....89

Tabela 4 Atividade enzimática absoluta (AA) e específica (AE) do hepatopâncreas de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (U).....92

Capítulo 5

Tabela 1 Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.106

Tabela 2 Dados de MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após o choque térmico.....115

Tabela 3 Dados de MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após o choque térmico.....118

Tabela 4 Dados de MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após 24 h de infecção com WSSV.122

Tabela 5 Dados de MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após 24 h de infecção com WSSV.124

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	19
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1 Carcinicultura e enfermidades.....	19
1.2 Aplicação econômica das algas pardas e seus compostos bioativos	22
1.3 Resistência ao estresse térmico.....	25
1.4 Espectrometria de massa por MALDI-TOF	28
2 OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS.....	30
Capítulo 2.....	31
Algas pardas como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico: efeitos sobre a resistência ao estresse térmico, microbiologia do intestino e imunologia.....	31
Resumo.....	32
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Material e métodos.....	35
Biomassa seca das macroalgas e análise bioquímica.....	35
Animais experimentais.....	37
Produção e composição química das dietas.....	37
Delineamento experimental.....	39
Análise da microbiota do trato intestinal	39
Análise de parâmetros hemato-imunológicos	39
Choque térmico	40
Análises dos dados.....	41
Resultados	41
Análise da microbiota do trato intestinal	41
Análise de parâmetros imunológicos	42

Choque térmico	43
Discussão.....	44
Agradecimentos.....	46
Referências.....	46
Capítulo 3.....	51
Resistência térmica do camarão-branco-do-pacífico alimentado com <i>Sargassum filipendula</i>: uma abordagem por MALDI-TOF MS	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	53
DESTAQUES.....	54
1. Introdução	54
2. Material e métodos.....	56
2.1. Macroalgas e dietas experimentais.....	56
2.2. Animais experimentais	57
2.3. Delineamento experimental	58
2.4. Choque térmico	58
2.5. Coleta das amostras e análise de MALDI-TOF MS.....	58
2.6. Análise de dados.....	60
3. Resultados.....	61
4. Discussão.....	67
5. Conclusão.....	71
Agradecimentos.....	72
Referências.....	72
Capítulo 4.....	77
Efeito da adição de diferentes níveis de algas pardas na dieta sobre o desempenho zootécnico, histologia do trato digestivo, atividade de enzimas digestivas e resistência ao desafio com vírus da Mancha Branca do camarão-branco-do-pacífico.....	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78

DESTAQUES	79
1. Introdução.....	79
2. Material e métodos	80
2.1. Animais experimentais.....	80
2.2. Biomassa seca das macroalgas e produção das dietas	80
2.3. Condições experimentais	84
2.4. Histologia do trato digestório	84
2.5. Atividade enzimática.....	85
2.6. Desafio com Vírus da Mancha Branca (WSSV).....	86
2.7. Análises estatísticas	87
3. Resultados	87
3.1. Desempenho zootécnico	87
3.2. Histologia do trato digestório	89
3.3. Atividade enzimática.....	91
3.4. Desafio com Vírus da Mancha Branca (WSSV).....	93
4. Discussão	93
5. Conclusão	96
Agradecimentos	96
Referências.....	96
Capítulo 5.....	101
Efeito combinado de duas espécies algas pardas sobre a resistência do camarão-branco-do-pacífico contra o choque térmico e a Mancha Branca.....	101
Resumo	101
Abstract.....	102
Introdução.....	103
Material e métodos	104
Animais experimentais.....	104
Biomassa seca das macroalgas	105
Dietas experimentais	105
Delineamento experimental.....	106

Choque térmico	107
Desafio com WSSV	108
Coleta e processamento das amostras e análise de MALDI-TOF MS	108
Análise dos dados	110
Resultados.....	110
Choque térmico	110
Desafio com WSSV	111
Discussão.....	113
Referências.....	126
4 CONCLUSÕES GERAIS.....	133
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO.....	135

Capítulo 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Carcinicultura e enfermidades

Segundo a *Food and Agriculture Organization of United Nations-FAO* (2016), o impacto das enfermidades na produção mundial de camarões é alarmante. Nos últimos anos, embora a produção global de camarões de cultivo tenha aumentado, os principais países produtores experimentaram declínios na produção devido à ocorrência de surtos de enfermidades, especialmente no continente asiático. Entre 2012 e 2014, a Tailândia, principal produtor e exportador de camarão do mundo, apresentou crescentes declínios de produção, e apenas no ano de 2015 demonstrou alguns sinais de recuperação.

Estes recentes declínios foram causados por surtos de uma nova enfermidade denominada AHPND (do inglês *Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease*), primeiramente chamada de EMS (do inglês *Early Mortality Syndrome*). Esta doença é causada por uma cepa bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* que carrega um plasmídeo produtor de toxinas, *Pir-toxins like*, responsável por provocar disfunções no hepatopâncreas e, conseqüentemente, a mortalidade de juvenis do camarão *Litopenaeus vannamei*, geralmente entre 20 e 45 dias após o povoamento das pós-larvas nos viveiros (TRAN et al., 2013; THITAMADEE et al., 2016).

No Brasil, a produção camaroneira seguiu a mesma tendência mundial, declinando de 75 mil toneladas em 2012 para 65 mil em 2014, enquanto que os demais países do continente americano apresentaram crescimento na produção neste mesmo período (Food and Agriculture Organization of United Nations, 2016). A Mancha Branca (WSD, do inglês *White Spot Disease*) é a principal causa desse declínio. Em Santa Catarina, reduziu drasticamente a produção camaroneira de 4.189 toneladas em 2004 para apenas 75 toneladas em 2014, provocando a quase extinção da Carcinicultura nesse estado. Além disso, desde de 2010, essa doença tem atingido diferentes estados da região nordeste, principal região produtora do país, e juntamente com a enfermidade viral Mionecrose Infecciosa, tem causado quedas expressivas da produção nessa região (BORBA; NOGUEIRA, 2013; CARVALHO FILHO, 2014; COSTA et al., 2010; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, 2016).

WSD é a enfermidade mais significativa no cultivo de camarões peneídeos. Desde sua detecção no início da década de 90 até o ano de 2012 causou prejuízos de aproximadamente USD 15 bilhões, os quais

umentam em torno de USD 1 bilhão a cada ano (LIGHTNER et al., 2012; VERBRUGGEN et al., 2016). Essa enfermidade tem como agente causador o WSSV (do inglês *White Spot Syndrome Virus*), um vírus de DNA dupla-fita, originalmente classificado como membro da família *Baculoviridae*, porém reclassificado como único membro do gênero *Whispovirus*, família *Nimaviridae*, após sequenciamento do seu DNA genômico. O WSSV caracteriza-se por ser um vírus de tamanho grande (virions com 80-120 nm de largura e 250-380 nm de comprimento), com envelope lipídico trilaminar, um único apêndice flagelar e formato variando de bacilar a elíptico (LIGHTNER et al., 2012).

Esse vírus possui ampla gama de possíveis hospedeiros, sendo 98 descritos até o momento, que variam de crustáceos decápodes, como camarões, lagostas e caranguejos, não-decápodes e outros grupos de invertebrados. Embora cause altas mortalidades em camarões de cultivo, sua virulência varia entre os diferentes hospedeiros. O caranguejo *Carcinus maenas*, por exemplo, demonstra poucos sinais patológicos e baixa mortalidade quando infectado. O WSSV é capaz de infectar todos os tecidos de origem ectodermal e mesodermal, como hemócitos, órgão linfoide, brânquias, epitélio cuticular e entre outros. Sua transmissão se dá principalmente pela via oral, através da ingestão de tecidos infectados (canibalismo) e, secundariamente, pela exposição à água contendo partículas virais. Já a transmissão vertical dos reprodutores para prole é praticamente nula, ocorrendo apenas quando as larvas entram em contato com resíduos infectados (carapaça, fezes e entre outros) provenientes dos reprodutores contaminados (SANCHEZ-PAZ et al., 2010; VERBRUGGEN et al., 2016).

Nos últimos anos, diversos esforços têm sido realizados para desenvolver produtos ou métodos de tratamento e/ou prevenção de enfermidades em camarões marinhos. A principal dificuldade no combate das doenças de camarões é a ausência de sistema imunológico adaptativo nesses animais, o que impossibilita a vacinação do modo “tradicional” (BARRACCO et al., 2014).

Dentre as estratégias desenvolvidas para combater enfermidades na Carcinicultura, Flegel (2012) aponta que a principal é a aplicação de métodos de cultivo biosseguros em associação com uso de linhagens de camarões livres de patógenos, os quais foram fundamentais para reduzir as perdas econômicas recorrentes na produção camaroneira asiática associadas a enfermidades, como AHPND e WSD. Nesse sentido, a utilização do sistema de bioflocos vêm se expandindo na Ásia e no mundo, pois apresenta alta biossegurança e produtividade (MOSS et al., 2012).

No Brasil, a utilização do sistema de bioflocos como medida de combate a WSD têm obtido resultados promissores. Na região sul do Brasil, em uma fazenda comercial com histórico de WSD no município de Laguna/SC, foram realizados ciclos de produção nos anos de 2011 e 2012 utilizando sistema de bioflocos, nos quais foram obtidos significativos índices de produção, sobrevivência em torno 75% e produtividade de 7 a 8 ton ha⁻¹ (Poersh et al., 2012). Em 2014, foi realizado um ciclo de produção utilizando sistema de bioflocos na Fazenda Experimental Yakult da Universidade Federal de Santa Catarina, também obtendo-se elevados índices de produção, sobrevivência de 75% e produtividade de 4,5 ton ha⁻¹, mesmo com histórico recente de surto de WSD (VIEIRA et al., 2014). Na região nordeste do Brasil, a Fazenda Camanor implantou um sistema baseado na tecnologia de bioflocos após sofrer quedas de produtividade de aproximadamente 90% entre os anos 2011 e 2013, em decorrência da WSD. Em 2014 obteve índices de produtividade expressivos, em torno de 19 ton ha⁻¹, quase 10 vezes maior que no ano anterior ao surto da doença (2 ton ha⁻¹) (CARVALHO FILHO, 2014). Entretanto, a expansão do sistema de bioflocos, bem como de outros métodos de cultivos biosseguros (ex.: sistema de recirculação) tem esbarrado no alto custo de implantação e necessidade de mão de obra especializada. Além disso, o sistema de bioflocos ainda necessita de aprimoramento em algumas técnicas de manejo que não estão completamente dominadas (AVNIMELECH, 2012).

Paralelamente, o desenvolvimento de métodos de “vacinação” alternativos, como “vacinas” de proteínas recombinantes, de DNA/RNA e RNA de interferência, têm demonstrado resultados promissores, que apontam para novas possibilidades para o combate de enfermidades na Carcinicultura. No entanto, esses métodos ainda se encontram em fase experimental, e têm muitas questões para serem resolvidas antes de serem aplicados em escala comercial, como questões logísticas e financeiras para sua aplicação em larga escala, e a duração da resistência dos animais vacinados, apresentada apenas por curtos períodos de tempo (MUSTHAQ; KWANG, 2011; SANCHEZ-PAZ et al., 2010; VERBRUGGEN et al., 2016).

Por fim, destaca-se também a utilização de prebióticos, probióticos e aditivos alimentares, como componentes da parede celular de fungos, sais orgânicos, extrato de plantas, micro e macroalgas. Diversos estudos têm demonstrado resultados promissores na prevenção de enfermidades de camarões utilizando extratos ou componentes isolados de plantas e algas (CHAKRABORTY et al., 2014; HUYNPH et

al., 2011; IMMANUEL et al., 2012, TOMAZELLI JUNIOR et al., 2017). Nesse sentido, há um crescente interesse na utilização de macroalgas como aditivo alimentar para camarões marinhos, devido as suas propriedades nutricionais, imunomoduladoras, antivirais, antibacterianas e promotoras de crescimento, que são decorrentes da abundância e complexidade de compostos bioativos que estes organismos apresentam (CRUZ-SUÁREZ et al., 2008; FLEURENCE et al., 2012; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016; PÁDUA et al., 2015; SANJEEWA et al., 2016). Além disso, a utilização de macroalgas como aditivo alimentar, constitui uma medida profilática com expressiva viabilidade, devido ao baixo custo e a facilidade de aplicação.

1.2 Aplicação econômica das algas pardas e seus compostos bioativos

O cultivo de plantas aquáticas é realizado em cerca de 50 países e, em termos de volume de produção, é dominado pelas macroalgas. Este setor econômico expandiu em torno de 8% ao ano na última década, mais que duplicando a produção neste período (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, 2016). Em 2014, a alga vermelha *Kappaphycus alvarezii* foi a espécie mais produzida no mundo, com produção aproximada de 11 milhões de toneladas, seguida da alga parda *Saccharina japonica*, com aproximadamente 7,7 milhões de toneladas. As algas pardas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum fusiforme* estão na 4ª e 6ª colocação, respectivamente, dentre as 10 espécies mais produzidas no mundo.

As macroalgas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* (Figura 1 a e b, respectivamente), utilizadas no presente estudo, pertencem ao grupo das algas pardas (Ochrophyta, Phaeophyceae). A espécie *S. filipendula* apresenta ampla distribuição, sendo encontrada no sudeste da Ásia, África, América do Norte, Central e do Sul, incluindo Brasil, porém não é uma alga explorada comercialmente (ALGAEBASE, 2017a). Já a *U. pinnatifida* é uma espécie com significativa importância comercial, sendo encontrada em quase todos os continentes, tais como Ásia, África, Oceania, Europa, América do Norte e Central. Na América do Sul é encontrada apenas na Argentina (ALGAEBASE, 2017b). O grupo das algas pardas destaca-se pelas suas diversas propriedades terapêuticas e abundância de compostos bioativos, em especial os polissacarídeos, fenóis e polifenóis, lipídeos e os terpenoides (LIU et al., 2012; MOHAMED; HASHIM; RAHMAN, 2012; SINURAT; MARRASKURANTO, 2012). Dentre os

polissacarídeos, destacam-se principalmente a fucoídiana, o alginato e a laminarina. O alginato ou ácido alginico é um polissacarídeo linear aniônico que contém resíduos (1,4)- β -D-ácido manurônico e α -L-ácido gulurônico, comercialmente utilizado com agente gelificante (BALBOA et al., 2013). O alginato de sódio com baixa massa molecular demonstrou ação imunoestimulante e antibacteriana em peixes (FUJIKI et al., 1994; VAN DOAN et al., 2016). A laminarina é composta por resíduos de (1,3)- β -D-glicopirranose, apresenta relativo baixo peso molecular e suas características estruturais variam entre as espécies de algas pardas. Pode atuar como modulador do metabolismo intestinal e ativador do sistema imune em diferentes espécies de animais, porém apresenta baixa capacidade antioxidante (BALBOA et al., 2013). Fucoídanas são polissacarídeos sulfatados complexos encontrados na matriz extracelular e parede celular de algas pardas. Elas representam 10-20% da massa seca destas algas e, de forma geral, são compostas por l-fucose, grupos sulfatados e uma ou mais porções pequenas com d-xilose, d-manose, d-galactose, l-raminose, arabinose, glicose, d-ácido glicurônico e grupos acetil. As fucoídanas são encontradas em algas pardas e em animais equinodermos, porém não são encontradas em outros grupos de algas e nem em plantas terrestres. Fucoídanas provenientes de algas pardas apresentam maior complexidade e heterogeneidade em sua estrutura e composição do que as sintetizadas em equinodermos. Existe uma ampla quantidade de estudos relacionados às atividades terapêuticas das fucoídanas em diferentes seres vivos, demonstrando atividades antitumorais, antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, de proteção contra radiação, osteoartrite, úlceras gástricas, danos oxidativos e até mesmo atuando como promotor de crescimento e na regeneração óssea (BALBOA et al., 2013; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016; WU et al., 2016).



Figura 1: a) Estrutura vegetativa de *Sargassum filipendula* (Fonte do autor); b) Estrutura vegetativa de *Undaria pinnatifida* (fonte: <https://www.lestaxinomes.org/media1204>).

Os terpenoides abrangem um grande número de metabólitos secundários sintetizados com unidades de isopreno, o qual é responsável pela vasta diversidade estrutural e funcional destes compostos. Baseado na quantidade de unidades de isopreno, os terpenoides são classificados como mono-, sesqui-, di-, sester-, tri- e tetraterpenoides. Dentre os triterpenoides, estão os esteróis, os quais são encontrados em diferentes tipos nas algas pardas, tais como etilenocolesterol, colesterol, ergosterol e fucoesterol, sendo este último o mais predominante neste grupo de algas. O fucoesterol possui diversos efeitos benéficos em humanos e animais, incluindo inibição da absorção do colesterol, antitumorígeno, antioxidante, antidiabético, anti-inflamatório, antibacteriano, antifúngico e antiulcerogênico. Adicionalmente, outro grupo importante de terpenoides são os carotenoides, os quais são classificados como tetraterpenoides com 8 unidades de isopreno. Nas algas pardas pode-se destacar a fucoxantina, um carotenoide com diversas funções terapêuticas em humanos e animais, tais como proteção contra raios UV, antiobesidade, anti-inflamatória, antiangiogênico, antidiabético, antioxidante e antitumorígeno. A fucoxantina é encontrada em altas concentrações nas algas *Undaria pinnatifida* e *Saccharina* sp., e é o principal produto extraído da alga *Sargassum muticum* (BALBOA et al., 2013; FERNANDO; NAH; JEON., 2016; MILLEDGE; NIELSEN; BAILEY, 2016).

Os compostos fenólicos representam um grupo amplo e diverso de metabólitos secundários constituídos de um ou mais grupamentos fenóis. Com base nas suas propriedades estruturais fundamentais, os compostos fenólicos variam de simples fenóis a moléculas complexas tais como ácidos fenólicos, flavonoides, flortaninos, coumarinas, ligninas, lignanas, estilbenos e seus derivados. Estes compostos são reconhecidos por suas extensas atividades bioativas para humanos e animais, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, antitumorígena, antimicrobiana, entre outras. As macroalgas marinhas, especialmente as algas pardas, têm sido extensivamente estudadas quanto ao seu rico conteúdo de compostos fenólicos. Neste grupo de macroalgas, pode-se destacar os flortaninos e o floriglucinol devido a sua importância como compostos bioativos (FERNANDO; NAH; JEON, 2016; PÁDUA et al., 2015).

Além disso, as algas pardas são ricas em outros componentes, como ácidos graxos saturados e poli-insaturados, vitaminas, especialmente vitamina C e E, e sais minerais, principalmente selênio, zinco, manganês e cobre. Estes componentes estão associados a diversas propriedades, em especial antioxidante e anti-inflamatória (BALBOA et

al., 2013; FERNANDO; NAH; JEON, 2016; SUSANTO et al., 2016). Por fim, as propriedades nutricionais e funcionais das macroalgas podem incrementar o desempenho zootécnico de camarões cultivados (GÓMEZ-GIL; ROQUE; TURNBULL, 2000). Cruz-Suárez et al. (2008) relataram que a inclusão de 4 a 10% de algas do gênero *Sargassum* na ração incrementa significativamente o crescimento de camarão-branco-do-pacífico, e Niu et al. (2015) observaram que a inclusão de 1 a 3% de biomassa seca de *U. pinnatifida* incrementou o desempenho zootécnico do camarão *Penaeus monodon*, sendo de 2 a 3% a melhor faixa de inclusão.

Dessa forma, considerando o atual cenário da Aquicultura mundial, a utilização da biomassa seca de algas pardas como aditivo alimentar para camarões marinhos apresenta enorme potencial. Primeiro, em decorrência da crescente expansão da produção mundial das macroalgas e, em segundo lugar, por ser um produto de baixo valor agregado, uma vez que não necessita alto investimento no processamento para produção da biomassa seca, gerando baixo custo para inclusão nas rações comerciais. Por fim, além de servirem como fonte de nutrientes para os camarões marinhos, podem auxiliar na modulação do sistema imunológico destes animais, de modo a torná-los mais resistentes às enfermidades, que atualmente são consideradas o principal problema da Carcinicultura mundial.

1.3 Resistência ao estresse térmico

Na região Sul do Brasil a indústria de produção de camarões marinhos enfrenta condições climáticas bastante instáveis, especialmente durante o primeiro ciclo de produção que se estende do final do inverno e início da primavera até o final da primavera e início do verão. Durante essas estações, é muito comum a ocorrência de períodos alternados com altas temperaturas e entradas de frentes frias acompanhadas por tempestades, as quais diminuem a temperatura do ar em até 10 °C em um curto período de tempo. O impacto desse clima instável sobre os camarões pode acarretar em redução de crescimento, mortalidades e aumento da suscetibilidade a doenças, uma vez que a flutuação de temperatura é um fator estressante, servindo de estímulo para o surgimento de surtos de enfermidades (KAUTSKY et al., 2000; THANIGAIVEL et al., 2016).

As algas pardas, particularmente as oriundas de ambientes frios, têm sido relacionadas à promoção da resistência ao estresse térmico em diferentes organismos. Kandasamy et al. (2011, 2014) demonstraram que o nematoide *Caenorhabditis elegans* apresentou maior resistência

ao estresse térmico e longevidade quando exposto a compostos extraídos da alga parda *Ascophyllum nodosum*. Além disso, Nair et al. (2012) relataram que estes componentes podem também aumentar significativamente a resistência da planta *Arabidopsis thaliana* ao congelamento. As espécies de algas pardas de ambientes temperados apresentam suas próprias estratégias para sobreviver à variação de temperatura, sendo submetidas a baixas temperaturas e até mesmo ao congelamento no inverno, e ainda a altas temperaturas quando expostas nos costões rochosos durante as marés baixas. Portanto, estas algas constituem uma possível alternativa para minimizar os efeitos da variação de temperatura sobre os organismos aquáticos cultiváveis, em especial camarões marinhos.

Os organismos ectotérmicos, tais como os camarões, são mais suscetíveis aos efeitos danosos da mudança de temperatura, uma vez que não podem controlar temperatura interna do organismo. A exposição ao frio provoca diversas mudanças fisiológicas, dentre as quais destacam-se as desordens neuromusculares causadas pela redução do gradiente de íons e disfunção das sinapses; perda da fluidez da membrana e mal funcionamento das proteínas transmembranas; degradação e agregação das proteínas; alterações na síntese de metabólitos e no metabolismo energético (HAYWARD; MANSO; COSSINS, 2014; PRUITT, 1990).

Por conseguinte, animais de regiões temperadas (animais tolerantes ao frio) desenvolveram mecanismos bioquímicos e fisiológicos para superar o estresse causado pelo frio. Para insetos, foram descritos alguns mecanismos relacionados à capacidade de resistir a esta condição, tais como aumento da expressão das aquaporinas, das enzimas de detoxificação e das proteínas de choque térmico, as quais são responsáveis, respectivamente, por facilitar o movimento da água entre os compartimentos celulares, reduzir o estresse oxidativo e inibir a desnaturação proteica. Esses insetos também são capazes de incrementar a síntese e/ou armazenamento de certos aminoácidos (ex.: prolina e arginina), carboidratos (ex.: glicose e trealose) e poliois (ex.: glicerol, sorbitol e inositol), os quais agem como potentes crioprotetores (CHOWANSKI et al., 2015; TEETS; DENLINGER, 2013). Estas moléculas são amplamente conhecidas como osmólitos orgânicos, cujas funções compreendem estabilizar as biomembranas e proteínas, bem como prevenir o dano osmótico nas células (YANCEY, 2005).

Além disso, insetos que apresentam resistência ao frio normalmente modificam seu metabolismo energético, inibindo a via aeróbica e estimulando a glicólise. Eles também reestruturam os mecanismos de transporte de íons, que são usualmente prejudicados

devido à redução da fluidez da membrana e da síntese de ATP (TEETS; DENLINGER, 2013). A redução da fluidez da membrana durante o resfriamento é particularmente danosa para o funcionamento celular, pois causa a imobilização das proteínas transmembranas, danos no processo de sinalização celular e transporte de nutrientes/íons. A adaptação da homeoviscosidade da membrana é um importante mecanismo para resistir ao frio (HAYWARD; MANSO; COSSINS, 2014; LEE JUNIOR et al., 2006; MALONE; COZZI; MARSHALL, 2015; PRUITT, 1990). Existem diversos mecanismos bioquímicos pelos quais pode-se aumentar a fluidez da membrana, dentre eles estão o incremento da proporção de ácidos graxos insaturados e colesterol, inserção de ácidos graxos insaturados na posição sn-2 dos glicerofosfolípídeos, elevação da proporção de ácidos graxos de cadeia curta e longa (16:0/18:0), e reestruturação dos grupos polares dos glicerofosfolípídeos (TEETS; DENLINGER, 2013).

Por outro lado, animais intolerantes ao frio podem tornar-se resistentes por meio da suplementação alimentar. Harpaz, Becker e Blum (1999) alimentaram o peixe *Pelvicachromis pulcher* com diferentes níveis de L-carnitina, e observaram aumento de pelo menos 50% na sobrevivência dos animais após 24 h de choque térmico. Analogamente, o peixe intolerante ao frio *Sparus aurata*, quando alimentado com dieta suplementada com taurina, L-betaína, vitamina C e fosfolípídeos insaturados demonstrou significativa resistência ao estresse por frio, que, por sua vez, foi associada ao aumento das defesas contra o estresse oxidativo, modulação do metabolismo energético e dos aminoácidos, e mitigação do estresse do retículo endoplasmático (RICHARD et al., 2016).

L. vannamei é uma espécie de camarão tropical com baixa tolerância ao frio (PENG et al., 2016; PONCE-PALAFIX; MARTINEZ-PALACIOS; ROSS, 1997). Neste contexto, a utilização de algas pardas como aditivo alimentar, além de aumentar a resistência dessa espécie ao estresse térmico, pode contribuir para o controle das enfermidades e o consequente impacto causado pelas mesmas na produtividade das fazendas de camarão, especialmente na região Sul do Brasil. Esse fato apresenta maior relevância quando se considera a tendência atual de utilizar produtos naturais para alimentação animal, como substituto a antibióticos e outros fármacos. Dessa forma, o uso da biomassa algácea constitui uma abordagem sustentável e ambientalmente amigável, pois tem como característica serem biodegradáveis, mantendo a qualidade da água dentro dos padrões de segurança sanitária e ambiental (THANIGAIVEL et al., 2016).

1.4 Espectrometria de massa por MALDI-TOF

MALDI-TOF MS (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) é uma técnica de espectrometria de massa que permite a detecção e análise de biomoléculas intactas, tais como proteínas, peptídeos, lipídeos e oligonucleotídeos diretamente a partir de células ou tecidos. A detecção direta de biomoléculas, principalmente proteínas, a partir de tecidos por meio da técnica de MALDI-TOF MS foi realizada primeiramente por Caprioli na final da década de 90. Em seguida, Sweedler e colaboradores foram capazes de analisar peptídeos diretamente de neurônios e gânglios (JACKSON; WOODS, 2009).

Nesta técnica, as biomoléculas são convertidas em íons pela adição de prótons, utilizando uma matriz. De forma geral, as matrizes são compostas de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, e são misturadas ou pulverizadas nas amostras de interesse. A desorção e ionização é realizada por laser, gerando íons com um próton a partir das biomoléculas do tecido, os quais são acelerados a um potencial fixo, e então separados uns dos outros através da razão de massa e carga (m/z). Durante a análise de MALDI-TOF, a razão m/z de cada íon é aferida pela determinação do tempo requerido para cada íon percorrer a extensão da câmara a vácuo ou tubo de vôo (SINGHAL et al., 2015).

As principais vantagens dessa técnica é a rapidez, alta sensibilidade mesmo utilizando amostras complexas (tecidos, células e entre outros), elevada tolerância a sais e outros contaminantes, e detecção de ampla faixa de massas com pouca fragmentação das biomoléculas (JACKSON; WOODS, 2009; SINGHAL et al., 2015). Além disso, pode gerar perfis de massa das grupos de biomoléculas específicas (proteínas, lipídeos e entre outras), que pode servir como padrão (“fingerprint”) para identificação de microrganismos, células expostas a toxinas e entre outros (KOBBER et al., 2015). Porém, como desvantagem, apresenta alto custo inicial para aquisição do equipamento (SINGHAL et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso das algas pardas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida* como aditivo alimentar no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a resistência ao choque térmico dos camarões alimentados com dietas suplementadas com as macroalgas;
- b) Analisar a microbiota bacteriana intestinal (bactérias totais e *Vibrio* spp. totais) e parâmetros hemato-imunológicos dos camarões alimentados com dietas suplementadas com as macroalgas;
- c) Avaliar os parâmetros zootécnicos, a atividade das enzimas digestivas e a histo-morfologia do intestino de camarões alimentados com dietas suplementadas com as macroalgas na engorda de camarões em água clara;
- d) Verificar a resposta dos camarões alimentados com dietas suplementadas com as macroalgas frente ao desafio com WSSV;
- e) Investigar os mecanismos de resistência ao choque térmico dos camarões alimentados com dieta suplementada com *S. filipendula*, através da técnica de MALDI-TOF
- f) Testar o efeito combinado das macroalgas sobre a resistência dos camarões contra o choque térmico e o desafio com WSSV.

3 FORMATAÇÃO DOS ARTIGOS

A tese é dividida em cinco capítulos: o primeiro referente à introdução e revisão de literatura; o segundo refere-se ao primeiro artigo científico original publicado no periódico *Journal of Applied Phycology* (doi:10.1007/s10811-017-1129-z); o terceiro trata de um artigo científico original que foi submetido para publicação no periódico *Aquaculture*; o quarto também descreve artigo científico original formatado para submissão para revista *Aquaculture*; o quinto refere-se ao artigo científico original que ganhou o prêmio de melhor trabalho da América Latina na competição *Alltech Young Scientist 2017* e está formatado conforme normas da competição (formatação escolhida: artigo publicado na *Journal of Applied Phycology*).

Capítulo 2

Algas pardas como aditivo alimentar para o camarão-branco-do-pacífico: efeitos sobre a resistência ao estresse térmico, microbiologia do intestino e imunologia

Delano Dias Schleder^{1,2}, Juliana Ribeiro da Rosa¹, Ariane Martins Guimarães¹, Fernanda Ramlov³, Marcelo Maraschin³, Walter Quadros Seiffert¹, Felipe do Nascimento Vieira¹, Leila Hayashi¹, Edegar Roberto Andreatta¹

Delano Dias Schleder

+55 48 3721-4103, delano.schleder@ifc-araquari.edu.br

¹Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

²Instituto Federal Catarinense - Campus de Araquari, Rodovia BR 280, km 27, Araquari, SC, 89245-000, Brasil

³Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Fitotecnia, Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

Resumo

Este trabalho avaliou a microbiologia do intestino, parâmetros hemato-imunológicos e a resistência ao choque térmico do camarão-branco-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% das algas pardas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula*. Os camarões foram cultivados em água clara por 15 dias em sete tanques de 800 L com 100 camarões (5.9 ± 0.2 g), sob aeração e temperatura ($28,7 \pm 0,1^\circ\text{C}$) constantes, e 80 % de renovação diária de água. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (6% da biomassa) durante todo período experimental. No 16° dia, foram avaliados a contagem de bactérias do intestino e os parâmetros hemato-imunológicos antes do choque térmico. Durante o choque térmico, os camarões foram transferidos da água salgada a 29°C para $12,5^\circ\text{C}$ por 1 h, colocados novamente em água a 29°C , e mantidos por 48 h para estimar a mortalidade cumulativa. Animais alimentados com 4% de *U. pinnatifida* apresentaram menor contagem de *Vibrio* spp. no intestino, e melhora na atividade da fenoloxidase em relação aos animais dos demais tratamentos e do grupo controle. Aqueles alimentados com 0,5 e 2% de *S. filipendula* demonstraram menor mortalidade cumulativa após choque térmico, em comparação com o controle e os alimentados com 4%. Níveis crescentes de *U. pinnatifida* tiveram efeitos negativos na resistência ao choque térmico. Em conclusão, *U. pinnatifida* melhorou a imunidade de camarões e reduziu especificamente *Vibrio* spp., enquanto que *S. filipendula* incrementou a resistência de camarões ao choque térmico.

Palavras-chaves: *Undaria pinnatifida*; *Sargassum filipendula*; Resistência ao choque térmico; atividade antimicrobiana; imunomodulação.

Abstract

This study evaluated the midgut microbiology, haemato-immunological parameters and the resistance to thermal shock of the white-leg shrimp *Litopenaeus vannamei* fed diets containing 0.5, 2 and 4% of the brown seaweeds *Undaria pinnatifida* and *Sargassum filipendula*. Shrimp were reared in clear seawater for 15 days in seven 800 L tanks with 100 shrimps (5.9 ± 0.2 g), under constant aeration and temperature (28.7 ± 0.1 °C), with 80 % of daily water exchange. Animals were fed four times *per* day (6% of biomass) during all experimental period. At 16th day, bacterial count of midgut and haemato-immunological parameters were assessed before the thermal shock, during thermal shock shrimp were transferred from seawater at 29 °C to 12.5 °C for 1 h, and then back to 29 °C, and kept for 48 h to estimate the cumulative mortality. Animals fed 4% of *U. pinnatifida* had lower *Vibrio* spp. quantity in the midgut, and showed an improvement of phenoloxidase activity. Those fed 0.5 and 2% of *S. filipendula* showed lower cumulative mortality after thermal shock, in comparison with control and those fed with 4% of this species. Increasing levels of *U. pinnatifida* had negative effects on thermal shock resistance. In conclusion, *U. pinnatifida* enhanced shrimp immunity and specifically inhibited *Vibrio* spp., while *S. filipendula* increased shrimp resistance to thermal variation.

Keywords: *Undaria pinnatifida*; *Sargassum filipendula*; Thermal shock resistance; Antimicrobial activity; Immunomodulation

Introdução

Algas pardas têm ganhado destaque devido aos seus compostos bioativos e seu potencial de aplicação em diversos setores da economia. Os compostos bioativos mais comumente encontrados são os polissacarídeos, terpenos, fenóis e polifenóis, minerais, ácidos graxos polinsaturados, vitaminas e carotenoides (Miyashita et al. 2013; Pádua et al. 2015; Sanjeewa et al. 2016). Estes compostos estão associados com diversas aplicações terapêuticas para humanos e animais.

Na Aquicultura há um crescente interesse em explorar as potencialidades das algas pardas. A incorporação destas algas nas dietas tem demonstrado resultados promissores para camarões (Cruz-Suárez et al. 2008; Cárdenas et al. 2015; Niu et al. 2015), abalone (Francis et al. 2008; Lee et al. 2016), e pepino-do-mar (Xia et al. 2012). Elas também têm sido empregadas com sucesso em sistemas multitróficos integrados, melhorando a ciclagem de nutrientes e reduzindo o impacto ambiental (Fleurence et al. 2012; Ratcliff et al. 2016). Além disso, muitos estudos demonstraram o efeito de suas propriedades bioativas na imunestimulação e resistência antimicrobiana em peixes e camarões (Huynh et al. 2011; Pádua et al. 2015; Yangthong et al. 2016).

As algas pardas e seus extratos têm demonstrado grande potencial no combate a doenças de camarões através da melhora na resposta imune e da inibição da proliferação dos agentes patogênicos, tais como bactérias e vírus (Chotigeat et al. 2004; Immanuel et al. 2015; Niu et al. 2015). Este fato recebe maior relevância quando se considera a tendência atual de uso de produtos naturais em substituição aos antibióticos sintéticos. A utilização de algas e seus extratos segue uma abordagem sustentável e ambientalmente amigável, uma vez que são biodegradáveis e podem manter a qualidade de água dentro dos padrões de segurança sanitária e ambiental (Thanigaivel et al. 2016).

Algas pardas, particularmente as oriundas de ambientes frios, demonstraram a capacidade de promover a resistência contra o estresse térmico em animais aquáticos. Nesses animais, a mudança abrupta de temperatura pode contribuir para supressão da resposta imune (Thanigaivel et al. 2016). As espécies de algas pardas apresentam suas próprias estratégias para sobreviver à variação de temperatura, sendo submetidas a baixas temperaturas no inverno, e à altas temperaturas quando expostas nos costões rochosos durante as marés baixas. Kandasamy et al. (2011, 2014) demonstraram que o nematoide *Caenorhabditis elegans* apresentou maior resistência ao estresse térmico

e longevidade quando exposto a compostos extraídos da alga parda *Ascophyllum nodosum*.

No Brasil, a indústria de produção de camarões marinhos tem sofrido significativas perdas econômicas devido à Doença da Mancha Branca, especialmente na região Sul do país, onde 98,2% da produção de camarões foi dizimada de 2004 a 2014. Adicionalmente, a região sul do Brasil enfrenta condições climáticas bastante instáveis, invernos com baixas temperaturas e durante a primavera ocorrência de variação abrupta de temperatura, apresentando períodos de temperaturas elevadas (cerca de 28 °C), alternados com entradas de frentes frias acompanhadas por tempestades e quedas de temperaturas de quase 10 °C em um curto período de tempo. O ciclo de produção de camarões no sul do Brasil começa a partir do final do inverno e início da primavera, portanto esses animais com frequência são submetidos a flutuações de temperatura estressantes, as quais podem afetar a produtividade e aumentar a suscetibilidade dos mesmos a surtos de enfermidades (Kautsky et al. 2000).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a resistência ao choque térmico bem como alguns parâmetros hematoimunológicos e a microbiologia do trato intestinal de camarões-brancos-do-pacífico *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo 0,5, 2 e 4% das algas pardas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula*.

Material e métodos

Biomassa seca das macroalgas e análise bioquímica

A macroalga *Sargassum filipendula* foi coletada (autorização ICMBio n°: 47187-1) na praia do Sambaqui, Florianópolis SC, Brasil (27°29'35.0"S 48°31'39.6"W), durante o outono (Abril, 2015), e transportada para o Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC). Primeiro, foi realizada a retirada manual de epífitas e qualquer material incrustado nas macroalgas, e em seguida essas foram lavadas com água doce e secas a temperatura ambiente por 4 h. Posteriormente, foram colocadas em estufa e secas por 24 h a 35 °C, e então a 50 °C até estabilizar o peso. As macroalgas secas foram então moídas, peneiradas (600 µm) e armazenadas em sacos plásticos escuros em sala refrigerada com desumidificador. A biomassa seca de *Undaria pinnatifida* foi gentilmente cedida pela empresa Soriano SA, Argentina. Os espécimes de *U. pinnatifida* foram coletados na Baía Bustamante, Chubut,

Argentina, durante o verão (Janeiro, 2015), secas ao sol, moídas e peneiradas a 600 μm .

A composição centesimal de ambas as espécies de algas foi realizada de acordo com os métodos descritos pela AOAC (1999). A análise de fenólicos totais foi feita segundo Schiavon et al. (2012), flavonoides totais de acordo com Zacarias et al. (2007), fucoxantina e luteína segundo Ramlov et al. (2014), e polissacarídeos sulfatados (fucoídano) conforme descrito por Hifney et al. (2016), com algumas modificações, como segue: as algas moídas (4 g) foram ressuspensas em 40 mL de tampão McIlvaine (100 mM ácido cítrico; 200 mM Na_2HPO_4 , pH 4,0), mantido a 65 °C por 3 h sob constante agitação mecânica, e então foram centrifugados a 2000 $\times g$ por 15 min. O sobrenadante foi misturado com solução de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3% p/v) na proporção 1:1 (v/v) e deixado *overnight* a 4 °C para precipitar o alginato. O alginato precipitado foi separado por filtração a vácuo (filtro de celulose, tamanho do poro 140 μm) e então foi adicionado etanol absoluto ao filtrado resultante (1:2 v/v), em seguida deixado *overnight* a 4 °C. O precipitado (polissacarídeo extraído) foi recuperado por centrifugação 6000 $\times g$ por 15 min, e seco a 50 °C *overnight*. O rendimento da fucoídano foi estimada com base na massa seca final de fucoídano como uma porcentagem da biomassa seca da alga (% da biomassa seca) (Tabela 1).

Tabela 1 Composição bioquímica e centesimal das algas secas *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*.

Composição bioquímica	<i>S. filipendula</i>	<i>U. pinnatifida</i>
Umidade ^a	107,8	93,1
Proteína bruta ^a	88,5	94,3
Extrato etéreo ^a	14,0	74,7
Fibra bruta ^a	101,7	35,0
Cinzas ^a	247,3	274,8
Energia bruta ^b	2.580	3.010
Compostos fenólicos totais ^c	103,8	623,1
Flavonoides totais ^d	249,4	264,2
Fucoxantina ^e	9,4	11,6
Luteína ^e	4,5	9,4
Polissacarídeo sulfatado (fucoídano) ^f	16,4	16,2

^ag kg⁻¹; ^bcal g⁻¹; ^c Valor médio de três extrações independentes, expressos como equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g g}^{-1}$); ^d Valor médio de três extrações independentes, expressos como equivalente de quercetina ($\mu\text{g g}^{-1}$); ^e $\mu\text{g g}^{-1}$; ^f Porcentagem da biomassa seca da alga (% biomassa seca)

Animais experimentais

Foram utilizados camarões da espécie *L. vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE HB12, adquirida da empresa Aquatec Aquacultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Após a larvicultura, as pós-larvas de 12 dias (PLs 12) foram transferidas para tanques de 50 ton na densidade de estocagem de 1000 PLs m⁻³ (fase de berçário) e cultivados em sistema de bioflocos até atingirem aproximadamente 5,5 g. Após a transferência para os tanques experimentais, os camarões foram aclimatados à nova condição por 8 h sem alimentação.

Produção e composição química das dietas

As dietas foram formuladas utilizando o programa Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para o camarão-branco-do-pacífico (Gong et al. 2000; NRC 2011; Zhou et al. 2012). Os ingredientes secos foram previamente moídos e peneirados a 600 µm. Posteriormente, os microingredientes foram homogeneizados por 10 min e adicionados aos macroingredientes, os quais foram homogeneizados por mais 10 min utilizando um misturador de comida. Em seguida, foram adicionados os óleos, lecitina de soja e água (200 mL kg⁻¹ da dieta), e a mistura resultante foi peletizada (tamanho do pellet: 1,00 cm comprimento x 0,25 cm largura) sob temperatura máxima de 50 °C em uma microextrusora (Inbramaq MX-40). Nas dietas experimentais, a biomassa seca das algas foi adicionada nos níveis 0,5, 2 e 4% em substituição ao caulim, enquanto que a dieta controle apresentou os mesmos ingredientes, porém sem adição das algas. A composição química foi analisada de acordo com o descrito por AOAC (1999) (Tabela 2).

Tabela 2 Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	C	<i>S. filipendula</i> (%)			<i>U. pinnatifida</i> (%)		
		0,5	2,0	4,0	0,5	2,0	4,0
Farinha de resíduo de salmão (640 g kg ⁻¹ PB)	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0
Farelo de soja (450 g kg ⁻¹ PB)	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0
Farinha de trigo	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0
Óleo de fígado de bacalhau	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Óleo de soja	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Lecitina de soja	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Premix vitamínico ^a	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
Premix mineral ^a	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2
Fosfato monocálcico	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Cloreto de sódio	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5
Cloreto de potássio	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Sulfato de magnésio	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Vitamina C ^b	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Carboximetilcelulose	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Caulim	102,8	97,8	82,8	62,8	97,8	82,8	62,8
<i>S. filipendula</i> (biomassa seca)	0,0	5,0	20,0	40,0	0,0	0,0	0,0
<i>U. pinnatifida</i> (biomassa seca)	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	40,0
Composição centesimal (g kg ⁻¹)							
Umidade	112,9	117,2	105,4	98,2	111,6	107,5	106,4
Proteína bruta	330,5	323,6	331,7	328,9	329,3	327,1	328,7
Extrato etéreo	73,4	70,0	64,3	68,4	67,3	68,8	69,9
Cinzas	182,4	175,6	172,9	166,0	180,2	172,6	166,2
Energia bruta ^c	3.667	3.692	3.672	3.776	3.664	3.689	3.787

^a – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D₃ - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K₃ - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹; cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹. ^b – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil); ^c – cal g⁻¹. PB: proteína bruta.

Delineamento experimental

Durante 15 dias, 100 camarões ($5,9 \pm 0,2$ g) por tratamento foram cultivados em tanques de polietileno de 800 L, contendo água salgada a $29\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob aeração constante e renovação diária de 80%. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia de acordo com cada tratamento a 6% da biomassa. Vinte e cinco camarões por tanque foram pesados semanalmente para monitorar o crescimento.

Ao longo do experimento, foram monitorados os principais parâmetros de qualidade de água, tais como: oxigênio dissolvido, temperatura e pH, avaliados duas vezes ao dia, salinidade, uma vez ao dia (multiparâmetro YSI, Professional Plus). Amônia total e nitrito foram avaliados uma vez por semana de acordo com Strickland e Parsons (1984) e APHA (1995). Todos os parâmetros avaliados se mantiverem em níveis adequados para o cultivo de *L. vannamei*, oxigênio dissolvido $5,72 \pm 0,04$ mg L⁻¹, temperatura $28,66 \pm 0,10$ °C, pH $8,02 \pm 0,07$, salinidade $32,88 \pm 0,27$ mg L⁻¹, amônia total $0,88 \pm 0,13$ mg L⁻¹ N-NH₃ e nitrito $0,08 \pm 0,09$ mg L⁻¹ N-NO₂.

No 16° dia, o intestino de 15 camarões de cada tratamento foi extraído (três *pools* de cinco animais) para contagem de bactérias do trato intestinal. Hemolinfa de 12 animais de cada tratamento (três *pools* de quatro animais) foi coletada para análises hemato-imunológicas. Trinta camarões de cada tratamento foram utilizados para avaliar a resistência ao choque térmico.

Análise da microbiota do trato intestinal

Foram amostrados tratos digestórios de 5 camarões por tanque (três *pools* por tratamento) após o término do experimento. Os tratos intestinais foram assepticamente extraídos, homogeneizados em um gal, diluídos serialmente (1/10) em solução salina estéril 3% e semeados em meio de cultura Agar Marine e Agar tiosulfato citrato bile sacarose - TCBS para contagem de bactérias heterotróficas totais e vibriônicas, respectivamente. Por último, foram efetuadas contagens totais de unidades formadoras de colônias (UFC) após 24 horas de incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Análise de parâmetros hemato-imunológicos

Foram amostrados 3 camarões por tanque (três *pools* por tratamento) após o término do experimento. A hemolinfa foi coletada do *sinus* ventral dos camarões, utilizando seringas estéreis de 1 mL de agulha 21 G resfriadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir da hemolinfa coletada, 40 µL

foram fixados em solução anticoagulante Alsever modificado (MAS do inglês *Modified Alsever Solution*) (citrato de sódio 27 mM, EDTA 9 mM, glicose 115 mM, NaCl 336 mM, pH 7,2) com 4% de formaldeído para contagem total de hemócitos. O restante foi deixado coagular no gelo por 2 h, então macerado e centrifugado repetidamente a $10.000 \times g$ por 10 min para obtenção do soro, o qual foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior realização das análises. O número de hemócitos por mililitro de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer.

Para a atividade aglutinante do soro, 50 μL de soro foi diluído seriadamente em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 5 mM MgCl_2 , pH 7,4) em uma placa de 96 poços com fundo côncavo. Cada poço recebeu 50 μL de solução de eritrócitos de cachorro a 2% em TBS-1, e as placas foram incubadas por 2 h em câmara úmida a temperatura ambiente. O controle foi feito substituindo o soro por TBS-1. O título aglutinante foi definido como o recíproco da última diluição capaz de aglutinar os eritrócitos, de acordo com Maggioni et al. (2004).

A atividade da enzima fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria (490 nm) por meio da formação do pigmento DOPAcromo (DO 490 nm), após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), usando a metodologia descrita por Söderhäll e Häll (1984). Primeiro, o soro foi diluído (1:7) em TBS-2 (10 mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 , pH 7,6), e 50 μL desta solução foram pré-incubados em um volume igual de tripsina (Sigma, 1 mg mL^{-1}), por 15 min a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em microplacas de 96 poços (fundo chato). Após incubação, 50 μL de L-DOPA (Sigma, 3 mg mL^{-1}) foram adicionados em cada poço, e a formação do dopacromo foi monitorada após 5 e 10 min. No controle, o soro foi substituído por TBS-1. A atividade da PO foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância $\text{minuto}^{-1} \text{ miligrama}^{-1}$ de proteína. A concentração de proteína na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

Choque térmico

Trinta animais de cada tratamento foram transferidos simultaneamente dos tanques com água salgada a $29,0 \pm 0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$, para aquários de 60 L contendo água salgada a $12,5 \pm 0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob aeração constante (em duplicata), e mantidos nestas condições por 1 h. Após este período, eles foram transferidos simultaneamente de volta para tanques com água salgada a $29,0 \pm 0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a sobrevivência foi monitorada por 48 h após choque térmico (hact). A água salgada usada durante todo

choque térmico foi proveniente do mesmo reservatório, apresentando a mesma salinidade 33,30 ‰.

Análises dos dados

Os dados de contagem de bactérias do intestino foram transformados para $\log_{10}(x + 1)$, e os de título aglutinante foram transformados em $\log_2(x + 1)$ antes de serem submetidos a análise estatística. A homoscedasticidade e normalidade dos dados foram avaliadas através dos testes Levene e Shapiro–Wilk, respectivamente. Os dados de contagem de bactérias do intestino e de título aglutinante foram submetidos a análise de variância unifatorial (ANOVA one way), seguido pelo teste de Tukey. Os dados de sobrevivência ao choque térmico foram analisados por Kaplan-Meier. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica 10 (StatSoft®), utilizando o nível de significância de 5%.

Resultados

Análise da microbiota do trato intestinal

Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) na contagem de bactérias heterotróficas totais no intestino dos camarões entre os tratamentos (Fig. 1). Entretanto, os camarões alimentados com 4% de *U. pinnatifida* apresentaram menor contagem de bactérias do gênero *Vibrio* quando comparado com o grupo controle.

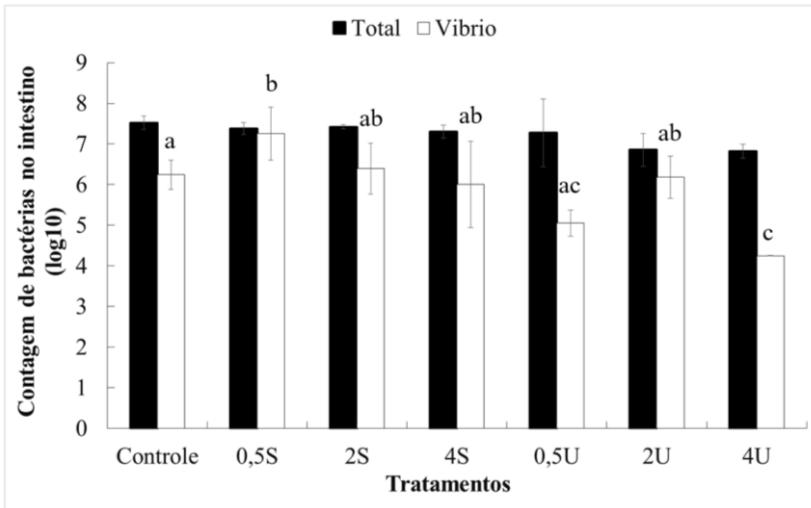


Fig. 1 Contagem de bactérias do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação. As barras de erro indicam o desvio padrão da média (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey (P<0,05).

Análise de parâmetros imunológicos

Os camarões alimentados com 4% de *U. pinnatifida* apresentaram uma melhora geral dos parâmetros hemato-imunológicos, no entanto nenhuma diferença significativa foi encontrada na contagem total de hemócitos, concentração proteica e título aglutinante em relação aos demais tratamentos, sendo apenas a atividade da PO significativamente maior (P < 0,05) em relação ao controle (Tabela 3).

Tabela 3 Parâmetros hemato-imunológicos de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação.

Tratamentos	Contagem total de hemócitos (cels mL ⁻¹)	Título de Agglutinação (log ₂ x+1)	Atividade da PO (unit min ⁻¹ mg ⁻¹ proteína)	Concentração proteica (mg mL ⁻¹)
Controle	38,1±17,2	11,3±0,6	24,8±3,0 ^a	137,0±25,6
0,5S	31,4±15,1	11,7±0,6	38,4±11,4 ^{ab}	141,6±6,0
2S	25,0±18,1	10,7±0,6	41,0±7,9 ^{ab}	153,1±13,6
4S	21,1±9,7	11,0±0,0	39,2±2,5 ^{ab}	139,9±4,9
0,5U	33,2±12,2	11,7±0,6	53,2±7,8 ^{ab}	139,7±6,3
2U	33,5±15,7	11,3±0,6	42,1±9,6 ^{ab}	134,9±13,1
4U	66,5±14,1	11,7±0,6	71,8±36,7 ^b	147,5±5,6

*Letras diferentes indicam diferenças significativas de acordo com o teste Tukey (P<0,05). Dados são médias ± desvio padrão de três réplicas independentes.

Choque térmico

Os camarões alimentados com 0,5 e 2% de *S. filipendula* demonstraram maior sobrevivência (P < 0,05) após choque térmico em relação aos camarões alimentados com as demais dietas. Camarões dos tratamentos controle e 4% *S. filipendula* apresentaram taxa de sobrevivência similar (P > 0,05). Os níveis crescentes de *U. pinnatifida* tiveram efeito negativo na resistência dos camarões ao choque térmico (Fig. 2).

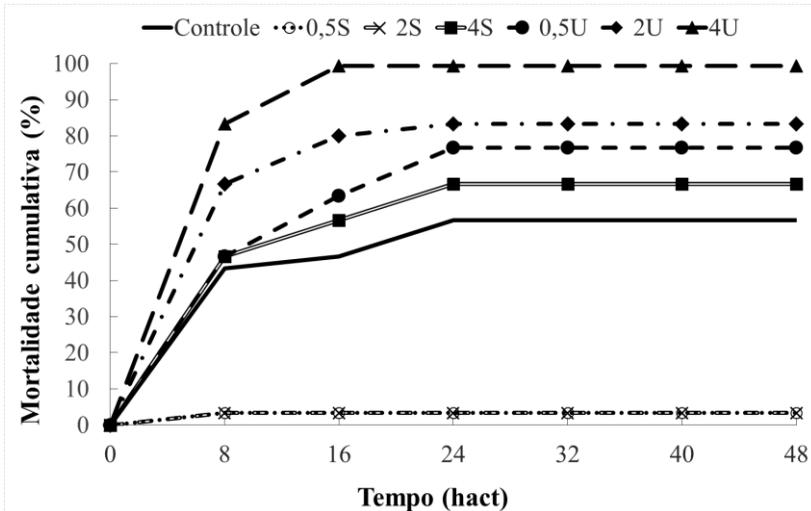


Fig. 2 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) ou *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e a dieta controle sem suplementação, durante 48 h após choque térmico (hact). Houve diferença ($P = 0,0001$) na mortalidade entre 0,5S e 2S e os demais tratamentos. Não houveram diferenças significativas ($P > 0,09$) entre 4S, 0,5U, 2U e controle. O tratamento 4U apresentou mortalidade significativamente maior ($P < 0,0001$) do que os demais tratamentos.

Discussão

O efeito de extratos ou de compostos isolados a partir de algas sobre a imunocompetência, resistência a infecções virais e bacterianas, e atividade antioxidante e antimicrobiana em animais aquáticos já foi descrito por diversos autores (Chotigeat et al. 2004; Immanuel et al. 2012; Kitikiew et al. 2013; Yangthong et al. 2016). Todavia, no presente trabalho, decidiu-se utilizar a biomassa seca de *U. pinnatifida* e *S. filipendula* como aditivo alimentar, devido ao menor custo de produção e viabilidade para indústria de nutrição animal.

Em geral, o maior nível de *U. pinnatifida* proporcionou melhora na imunocompetência dos camarões e reduziu a contagem de *Vibrio* spp. no intestino, em oposição às dietas com *S. filipendula*, que não afetaram os parâmetros hemato-imunológicos e a contagem de bactérias. Por outro lado, os animais alimentados com 0,5 e 2% de *S. filipendula* apresentaram maior sobrevivência após choque térmico, enquanto níveis crescentes de *U. pinnatifida* tiveram efeitos negativos na resistência ao choque térmico.

Ambas as espécies contêm ampla variedade de compostos bioativos, tais como fucanas, carotenoides, alginato, polifenóis, terpenoides e entre outros (Miyashita et al. 2013; Sanjeeva et al. 2016), que poderiam explicar os diferentes efeitos sobre o camarão. De fato, estes resultados demonstraram que *S. filipendula* e *U. pinnatifida* apresentaram variações na composição bioquímica relacionadas a polissacarídeos sulfatados, flavonoides, compostos fenólicos, fucoxantina, luteína e composição centesimal (Tabela 1). O incremento da atividade imune e antimicrobiana contra bactérias e fungos está mais relacionado com os terpenoides, compostos fenólicos livres, fucanas, e alguns tipos de ácidos graxos e esteróis presentes nas algas pardas (Milledge et al. 2016; Thanigaivel et al. 2016). A biomassa seca da *U. pinnatifida* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais, flavonoides, fucoxantina e luteína do que *S. filipendula*, o que poderia explicar o aumento da atividade da PO e a redução de *Vibrio* spp. no intestino dos camarões do tratamento com 4% de *U. pinnatifida*. Similarmente, Niu et al. (2015) relataram o aumento da atividade da PO em juvenis do camarão *Penaeus monodon* alimentados com dietas contendo de 1 a 6% da biomassa seca de *U. pinnatifida*, e da superóxido dismutase no tratamento com 6%. Esses resultados corroboram a efetividade dessa alga, em termos de matéria seca, em modular o sistema imune de camarões.

Os níveis crescentes de *U. pinnatifida* reduziram expressivamente a resistência dos camarões ao choque térmico. Lee et al. (2016) também constataram que *U. pinnatifida* seca incrementou a mortalidade cumulativa do abalone *Haliote discus* submetidos a diferentes tipos de estresse, tais como exposição ao ar, salinidade e variação de temperatura. Infelizmente, os mecanismos por trás dessas observações ainda são desconhecidos, sendo necessário futuras investigações para compreendê-las.

Por outro lado, os menores níveis de *S. filipendula* reduziram significativamente a mortalidade dos camarões após o choque térmico. A mortalidade verificada após o choque térmico pode estar associada a danos estruturais nas proteínas e outras biomoléculas, e mudanças estruturais e funcionais nas membranas celulares (Pruitt 1990). Ademais, as mortalidades podem ter sido decorrentes da condição de hipóxia e re-oxigenação imposta pelo choque térmico, uma vez que os camarões reduzem expressivamente seu metabolismo durante o ciclo de frio (12,5 °C) e aumentam novamente quando transferidos de volta a água a 29°C. A hipóxia e re-oxigenação normalmente provoca a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo, causando

peroxidação de lipídios, dano oxidativo, e inviabilidade celular (Hermes-Lima et al. 2015). Em camarões, García-Triana et al. (2016) e Li et al. (2016) demonstraram que a hipóxia e re-oxigenação provocou produção de EROs e peroxidação de lipídios em diferentes tecidos.

Conseqüentemente, isto sugere que a resistência dos camarões ao choque térmico recai sobre uma resposta fisiológica multifatorial provocada pela adição da alga. No presente trabalho, *S. filipendula* apresentou conteúdo considerável de fucoídano, porém similar ao da *U. pinnatifida*, enquanto que a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides, fucoxantina e luteína foi menor. Portanto, novos estudos devem ser feitos para compreender os mecanismos responsáveis pela resistência ao choque térmico e os efeitos da biomassa seca de *S. filipendula* sobre estes mecanismos, bem como a razão pela qual o maior nível desta alga não apresentou efeito protetivo contra o choque térmico.

Em conclusão, 4% de biomassa seca *U. pinnatifida* melhorou a resposta imune do camarão e reduziu vv *Vibrio* spp., o grupo de bactérias patogênicas mais importante para o cultivo de camarões, enquanto que 0,5 e 2% de *S. filipendula* aumentaram a resistência dos camarões à variação térmica que, por sua vez, pode ser especialmente vantajosa para o cultivo de camarões em regiões com condições climáticas instáveis, como a região sul do Brasil.

Agradecimentos

Este trabalho foi por financiado pela FAPESC, CAPES e CNPq. Somos gratos ao Gonzalo Soriano da Soriano SA. por fornecer gentilmente a biomassa seca de *Undaria pinnatifida*. Delano Dias Schleder recebeu bolsa da CAPES e licença para capacitação do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA). Por fim, agradecemos as bolsas de produtividade pagas pelo CNPq aos pesquisadores Felipe Vieira, Walter Seiffert, Marcelo Maraschin e Leila Hayashi.

Referências

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1999) Official Methods of Analysis. 16th edn. OMA, Arlington.

APHA, American Public Health Association (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA Inc, Baltimore.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254.

- Cárdenas JV, Gálvez AO, Brito LO, Galarza EV, Pitta DC, Rubin VV (2015) Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system *Aquacult Int* 23:1491-1504.
- Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004) Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture* 30:233-237.
- Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Ricque-Merie D (2008) A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: Cruz-Suárez LE, Marie DR, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Cavazos DAV, Lazo JP (eds) *Avances en Nutrición Acuícola IX*. UANL, Monterrey, pp 304-333.
- Fleurence J, Morançais M, Dumay J, Decottignies P, Turpin V, Munier M, Garcia-Bueno N, Jaouen P (2012) What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. *Trends Food Sci Tech* 27:57-61.
- Francis TL, Maneveldt GW, Venter J (2008) Determining the most appropriate feeding regime for the south African abalone *Haliotis midae* Linnaeus grown on kelp. *J Appl Phycol* 20:597-602.
- García-Triana A, Peregrino-Uriarte AB, Yepiz-Plascencia G (2016) Selenoprotein M gene expression, peroxidases activity and hydrogen peroxide concentration are differentially regulated in gill and hepatopancreas of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* during hypoxia and reoxygenation. *Comp Biochem Phys A* 199:14-20.
- Gong H, Lawrence AL, Jiang DH, Castille FL, Gatlin DM (2000) Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. *Aquaculture* 190:305-324.
- Hermes-Lima M, Moreira DC, Rivera-Ingraham GA, Giraud-Billoud M, Genaro-Mattos TC, Campos EG (2015) Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Bio Med* 89:1122-1143.
- Hifney AF, Fawzy MA, Abdel-Gawad KM, Gomaa M (2016) Industrial optimization of fucoidan extraction from *Sargassum* sp. and its potential antioxidant and emulsifying activities. *Food Hydrocolloid* 56:77-88.
- Huynh T, Yeh ST, Lin YC, Shyu JF, Chen LL, Chen JC (2011) White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immun* 31:286-293.

- Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesama A (2012) The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish Shellfish Immun* 32:551-564.
- Kandasamy S, Fan D, Sangha JS, Khan W, Evans F, Critchley AT, Prithiviraj B (2011) Tasco[®], a product of *Ascophyllum nodosum*, imparts thermal stress tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Mar Drugs* 9:2256-2282.
- Kandasamy S, Khan W, Evans FD, Critchley AT, Zhang J, Fitton JH, Stringer DN, Gardiner VA, Prithiviraj B (2014) A fucose containing polymer-rich fraction from the brown alga *Ascophyllum nodosum* mediates lifespan increase and thermal-tolerance in *Caenorhabditis elegans*, by differential effects on gene and protein expression. *Food Funct* 5:275-284.
- Kautsky N, Rönnbäck P, Tedengren M, Troell M (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.
- Kitikiew S, Chen JC, Putra DF, Lin YC, Yeh ST, Liou CH (2013) Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immun* 34:280-290.
- Lee KW, Kim HS, Yun A, Choi DG, Jang BI, Kim HJ, Cho SH, Joo YI, Kim BH, Min BH (2016) Effect of the formulated diets on performance and resistance of juvenile abalone [*Haliotis discus* (Reeve, 1846)] subjected to various stress conditions. *J Shellfish Res* 35(2):481-491.
- Li Y, Wei L, Cao J, Qiu L, Jiang X, Li P, Song Q, Zhou H, Han Q, Diao X (2016) Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 144:234-240.
- Maggioni DG, Andreatta ER, Hermes EM, Barracco MA (2004) Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immune stimulation. *Aquaculture* 241:501-515.
- Miyashitaa K, Mikamia N, Hosokawaa M (2013) Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J Funct Food* 5:1507-1517.
- Milledge JJ, Nielsen BV, Bailey D (2016) High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. *Rev Environ Sci Biotechnol* 15:67-88.

- Niu J, Chen X, Lu X, Jiang SG, Lin HZ, Liu YJ, Huang Z, Wang J, Wang Y, Tian LX (2015) Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 435:78–85.
- NRC, National Research Council (2011) Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academic Press, Washington.
- Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, Ramosa AA (2015) Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochem Lett* 14:91-98.
- Pruitt NL (1990) Adaptations to temperature in the cellular membranes of Crustacea: membrane structure and metabolism. *J Therm Biol* 15:1-8.
- Ratcliff JJ, Wana AHL, Edwards MD, Soler-Vila A, Johnson MP, Abreu MH, Morrison L (2016) Metal content of kelp (*Laminaria digitata*) co-cultivated with Atlantic salmon in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture system. *Aquaculture* 450:234-243.
- Ramlov F, Carvalho TJG, Schmidt EC, Martins CDL, Kreusch MG, Oliveira ER, Bauer CM, Bouzon ZL, Horta PA, Maraschin M (2014) Metabolic and cellular alterations induced by diesel oil in *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). *J Appl Phycol* 26:1879-1888.
- Sanjeewa KKA, Kim EA, Son KT, Jeona YJ (2016) Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. *J Photoch Photobio B* 162:100-105.
- Schiavon M, Moro I, Pilon-Smits EAH, Matozzo V, Malagoli M, Dalla-Vecchia, F (2012) Accumulation of selenium in *Ulva* sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites. *Aquat Toxicol* 122-123:222-231.
- Söderhäll K, Häll L (1984) Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. *Biochim Biophys Acta* 797:99-104.
- Strickland JD, Parsons TR (1984) A practical handbook of seawater analysis (Bulletin 167), 2nd edn, Unipub, Ottawa.
- Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, Thomas J (2016) Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464: 529-536.
- Xia S, Zhao P, Chen K, Li Y, Liu S, Zhang L, Yang H (2012) Feeding preferences of the sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka) on various seaweed diets. *Aquaculture* 344-349: 205-209.
- Yangthong M, Hutadilok-Towatana N, Thawonsuwan J, Phromkunthong W (2016) An aqueous extract from *Sargassum* sp.

enhances the immune response and resistance against *Streptococcus iniae* in the Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). J Appl Phycol 28: 3587-3598.

Zacarias AA, Moresco HH, Horst H, Brighente IMC, Marques MCA, Pizzollati MG (2007). Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP, 2007. CD-ROM.

Zhou Q, Zeng WP, Wang HL, Wang T, Wang YL, Xie FJ (2012) Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 364-365:252-258.

Capítulo 3

Resistência térmica do camarão-branco-do-pacífico alimentado com *Sargassum filipendula*: uma abordagem por MALDI-TOF MS

Delano Dias Schleder^{a,b*}, Martina Blank^c, Luiz Guilherme Buglione Peruch^a, Felipe do Nascimento Vieira^a, Edeimar Roberto Andreatta^a, Leila Hayashi^a

^aUniversidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

^bInstituto Federal Catarinense - Campus de Araquari, Araquari, SC, Santa Catarina, Brazil

^cUniversidade Federal de Santa Catarina, Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

*Corresponding author

E-mail: delano.schleider@ifc.edu.br

Tel: +55 48 3721-4103

Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Camarões Marinhos, Servidão dos Coroas, 503, Barra da Lagoa, 88061-600, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

RESUMO

O presente trabalho avaliou o perfil de lipídeos e proteínas em hemócitos de *Litopenaeus vannamei* alimentados com 0,5% da alga parda *Sargassum filipendula* por MALDI-TOF MS, com objetivo de compreender o efeito dessa alga sobre a resistência dos camarões ao choque térmico. Camarões ($13,0 \pm 0,4$ g) foram cultivados por 15 dias em tanques de 800 L (35 animais por tanque) em duplicata, sob aeração e temperatura (28,5 °C) constantes, 100% de renovação da água e alimentação quatro vezes ao dia. No dia 16, os animais foram submetidos ao choque térmico, sendo transferidos da temperatura 28,5 °C para 11,5 °C por 1 h, e colocados novamente a 28,5 °C. A mortalidade foi monitorada durante 24 h. Foi coletada hemolinfa de 10 animais por tratamento (controle e 0;5% *S. filipendula*), antes e 15 min depois do choque térmico para análises de MALDI-TOF MS. Os hemócitos foram processados sob duas formas: células intactas e lisadas. Em seguida, as amostras foram misturadas (1:1) com a matriz 2,5-ácido dihidroxi-benzoico para análise de lipídeos e a matriz ácido sinapínico para proteína. Camarões alimentados com 0,5% *S. filipendula* apresentaram maior intensidade de sinal para fosfatidilcolinas com ácidos graxos insaturados e menor para lisofosfatidilcolinas. Quanto às proteínas, *S. filipendula* incrementou os sinais associados a peptídeos antimicrobianos e histona H2A, enquanto reduziu sinais relacionados a subunidades de citocromo c oxidase. Em conclusão, *S. filipendula* causou aumento na fluidez da membrana e na defesa antimicrobiana, diminuição de sinalizadores de apoptose, e modulação na regulação do DNA e no metabolismo energético e dos lipídeos nos hemócitos dos camarões.

Palavras-chaves: Alga parda, Choque térmico, Resistência, MALDI-TOF MS, Hemócitos; *Litopenaeus vannamei*

ABSTRACT

This work aimed to evaluate lipid and protein profiles in hemocytes of *Litopenaeus vannamei* fed 0.5% of the brown seaweed *Sargassum filipendula* by MALDI-TOF MS, in order to understand the seaweed effect on thermal shock resistance. Shrimp (13.0 ± 0.4 g) were reared during 15 days in 800 L tanks (35 shrimps tank⁻¹) in duplicate, under constant aeration and temperature (28.5 °C), 100% of daily water exchange and feeding four times day⁻¹. At day 16, animals were submitted to thermal shock, passing from seawater at 28.5 °C to 11.5 °C, kept for 1 h, and then back to 28.5 °C. Mortality was monitored during 24 h. Hemolymph of 10 animals *per* treatment (control and 0.5% *S. filipendula*) was collected before and 15 min after thermal shock for MALDI-TOF MS analyses. Hemocytes were processed in two forms: intact and lysed cells. Samples were mixed (1:1) with 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix for lipid analysis and sinapinic acid for protein. Shrimp fed 0.5% *S. filipendula* showed higher signal intensity of phosphatidilcholines with unsaturated fatty acids and lower signal intensity of lysophosphatidilcholines. For proteins, *S. filipendula* increased signals that could be associated to antimicrobial peptides and histone H2A, whereas reduced signals related to cytochrome c oxidase subunits. In conclusion, *S. filipendula* increased membrane fluidity and antimicrobial defense, diminished apoptosis signaling, and modulated DNA regulation, lipid and energy metabolism of shrimp hemocytes.

Keywords: Brown seaweed, Thermal shock, Resistance, MALDI-TOF MS, Hemocyte, *Litopenaeus vannamei*

DESTAQUES

Camarões alimentados com 0,5% de *Sargassum filipendula* apresentaram maior resistência ao choque térmico;

O perfil de proteínas do hemócitos por MALDI-TOF MS revelou que *S. filipendula* incrementou a defesa antimicrobiana e modulou a regulação do DNA e o metabolismo energético dos camarões;

O perfil de lipídeos do hemócitos por MALDI-TOF MS revelou que *S. filipendula* incrementou a fluidez de membrana, reduziu sinalizadores de apoptose e modulou o metabolismo de lipídeos dos camarões.

1. Introdução

As algas pardas possuem alto valor nutricional e uma ampla diversidade de compostos bioativos. Por estas razões, a aplicação desse grupo de algas como ingrediente nutricional e funcional para alimentação humana e animal tem crescido nos últimos anos (Fleurence et al., 2012; Miyashita et al., 2013; Thanigaivel et al., 2016). Além disso, Kandasamy et al. (2014, 2011) relataram que a alga parda *Ascophyllum nodosum* pode incrementar a resistência do nematoide *Caenorhabditis elegans* ao estresse térmico. Similarmente, em nosso trabalho anterior, camarões *Litopennaeus vannamei* alimentados com 0,5 e 2% da alga parda *Sargassum filipendula* apresentaram significativo aumento na sobrevivência após o choque térmico (aproximadamente 97%, enquanto o grupo controle apresentou 43%), enquanto que níveis crescentes da alga parda *Undaria pinnatifida* apresentaram efeito oposto na resistência dos animais (Schleder et al., 2017).

O estresse por frio impõe múltiplas disfunções fisiológicas nos organismos ectotérmicos, incluindo perda da integridade de proteínas e das membranas celulares, mau funcionamento da respiração celular na mitocôndria, estresse oxidativo e desordens na homeostase de íons e coordenação neuromuscular (Hayward et al., 2014). Para produção de camarão, estresses ambientais desta natureza podem levar a perdas de produtividade, devido a problemas de crescimento, supressão da resposta imune e aumento da suscetibilidade a doenças (Kautsky et al., 2000). No Brasil, surtos de enfermidades têm afetado expressivamente o setor de produção de camarão, levando a perdas econômicas massivas, especialmente no Sul do Brasil. O clima da região Sul do Brasil é bastante instável, mostrando alta flutuação de temperatura durante o ciclo

de produção, podendo servir como importante gatilho natural para tais surtos.

Organismos ectotérmicos, como os camarões, são mais suscetíveis aos efeitos danosos da mudança de temperatura, uma vez que não podem controlar temperatura interna do organismo. Por conseguinte, animais de regiões temperadas (animais tolerantes ao frio) desenvolveram mecanismos bioquímicos e fisiológicos para superar o estresse causado pelo frio. Para insetos, foram descritos alguns mecanismos relacionados à capacidade de resistir a esta condição, tais como aumento da expressão de aquaporinas, de enzimas de detoxificação e de proteínas de choque térmico, as quais são responsáveis, respectivamente, por facilitar o movimento da água entre os compartimentos celulares, reduzir o estresse oxidativo e inibir a desnaturação proteica. Esses insetos, também são capazes de incrementar a síntese e/ou armazenamento de certos aminoácidos (ex.: prolina e arginina), carboidratos (ex.: glicose e trealose) e poliois (ex.: glicerol, sorbitol e inositol), os quais agem como potentes crioprotetores (Chowanski et al., 2015; Teets e Denlinger, 2013). Estas moléculas são amplamente conhecidas como osmólitos orgânicos, cujas funções compreendem estabilizar as biomembranas e proteínas, bem como prevenir o dano osmótico nas células (Yancey, 2005).

Além disso, insetos que apresentam resistência ao frio normalmente modificam seu metabolismo energético, inibindo a via aeróbica e estimulando a glicólise. Eles também reestruturam os mecanismos de transporte de íons, que são usualmente prejudicados devido à redução na fluidez da membrana e da síntese de ATP (Teets e Denlinger, 2013). A redução da fluidez da membrana durante o resfriamento é particularmente danosa para o funcionamento celular, pois causa a imobilização das proteínas transmembranas, danos no processo de sinalização celular e transporte de nutrientes/íons. A adaptação da homeoviscosidade da membrana é um importante mecanismo para resistir ao frio (Hayward et al., 2014; Lee Jr. et al., 2006; Malone et al., 2015; Pruitt, 1990). Existem diversos mecanismos bioquímicos pelos quais pode aumentar a fluidez da membrana, dentre eles estão o incremento da proporção de ácidos graxos insaturados e colesterol, inserção de ácidos graxos insaturados na posição sn-2 dos glicerofosfolipídeos, elevação da proporção de ácidos graxos de cadeia curta e longa (16:0/18:0), e reestruturação dos grupos polares dos glicerofosfolipídeos (Teets e Denlinger, 2013).

Por outro lado, animais intolerantes ao frio podem tornar-se resistentes com a suplementação alimentar. Harpaz et al. (1999)

alimentaram o peixe *Pelvicachromis pulcher* com diferentes níveis de L-carnitina, e observaram aumento de pelo menos 50% na sobrevivência dos animais após 24 h de choque térmico. Analogamente, o peixe intolerante ao frio *Sparus aurata*, quando alimentado com dieta suplementada com taurina, L-betaína, vitamina C e fosfolipídeos insaturados demonstrou significativa resistência ao estresse por frio, que, por sua vez, foi associada ao aumento das defesas contra o estresse oxidativo, modulação do metabolismo energético e dos aminoácidos, e mitigação do estresse do retículo endoplasmático (Richard et al., 2016).

L. vannamei é uma espécie de camarão tropical com baixa tolerância ao frio (Peng et al., 2016; Ponce-Palafox et al., 1997). Neste sentido, o aumento da resistência dos camarões ao choque térmico causado por *S. filipendula*, conforme observado em nosso trabalho anterior, levantou questionamentos sobre os mecanismos responsáveis por esta resistência, uma vez que as análises de composição bioquímica e proximal das algas não permitiram nenhuma conclusão (Schleder et al., 2017). Portanto, a utilização da análise de espectrometria de massas por dessorção/ionização a laser assistida por matriz – tempo de voo (MALDI-TOF MS) pode trazer indícios interessantes sobre esses mecanismos, já que se trata de uma tecnologia de alta precisão, que permite a varredura e identificação eficiente de compostos em amostras biológicas complexas sem necessitar de isolamento e purificação. Nos últimos anos, inúmeras aplicações da análise de MALDI-TOF MS têm surgido, revelando-a como uma ferramenta útil não apenas para análise de proteínas, mas também para lipídeos (Kuhn-Nentwig et al., 2014).

No presente trabalho, utilizou-se a técnica de espectrometria de massas MALDI-TOF MS para avaliar o perfil de proteínas e lipídeos de hemócitos intactos e lisados de juvenis do camarão-branco-do-pacífico, *L. vannamei*, alimentado com 0,5% de *S. filipendula* e submetido ao choque térmico.

2. Material e métodos

2.1. Macroalgas e dietas experimentais

A biomassa seca de *S. filipendula* e as dietas utilizadas no presente trabalho foram as mesmas do trabalho Schleder et al. (2017). A adição de 0,5% da biomassa seca de *S. filipendula* foi realizada em substituição ao caulim, ingrediente inerte usado para preenchimento, enquanto que a dieta controle apresentou a mesma formulação, porém sem a adição da alga. A composição centesimal foi realizada conforme metodologia descrita por AOAC (1999) (Tabela 1).

Tabela 1 Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Controle	0,5 % <i>S. filipendula</i>
Farinha de resíduo de salmão (640 g kg ⁻¹ PB)	220,0	220,0
Farelo de soja (450 g kg ⁻¹ PB)	370,0	370,0
Farinha de trigo	150,0	150,0
Óleo de fígado de bacalhau	35,0	35,0
Óleo de soja	10,0	10,0
Lecitina de soja	25,0	25,0
Premix vitamínico ^a	3,8	3,8
Premix mineral ^a	16,2	16,2
Fosfato monocalcico	25,0	25,0
Cloreto de sódio	11,5	11,5
Cloreto de potássio	10,0	10,0
Sulfato de magnésio	15,0	15,0
Vitamina C ^b	0,7	0,7
Carboximetilcelulose	5,0	5,0
Caulim	102,8	97,8
<i>S. filipendula</i> (biomassa seca)	0,0	5,0
Composição centesimal (g kg ⁻¹)		
Umidade	112,9	117,2
Proteína bruta	330,5	323,6
Extrato etéreo	73,4	70,0
Cinzas	182,4	175,6
Energia bruta ^c	3.667	3.692

^a – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D3 - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K3 - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹; cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹. ^b – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil); ^c – cal g⁻¹. PB: proteína bruta.

2.2. Animais experimentais

Foram utilizados camarões da espécie *L. vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE HB12, adquirida da empresa Aquatec Aquacultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brasil). Após a larvicultura, as pós-larvas de 12 dias (PLs 12) foram transferidas para tanques de 50 ton a uma densidade de 2000 PLs m⁻³ (fase de berçário) e cultivados em sistema de bioflocos. Quando os camarões atingiram

aproximadamente 2 g, eles foram realocados para novos tanques (50 ton) e cultivados até o tamanho de cerca de 13 g na densidade de estocagem de 200 camarões m^{-3} em sistema de bioflocos. Após a transferência para os tanques experimentais, os camarões foram aclimatados à nova condição por 8 h sem alimentação.

2.3. Delineamento experimental

Tanques de polietileno (800 L) contendo água salgada a $28,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob aeração constante foram estocados com 30 camarões ($13,0 \pm 0,4\text{ g}$), e cultivados durante 15 dias. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia de acordo com o tratamento a 4% da biomassa, em duplicata. Nos dias 1, 7 e 15 de cultivo foram pesados 25 camarões por tanque para monitorar o crescimento.

Ao longo do experimento, foram feitas renovações diárias de 100% da água dos tanques, e monitorados os principais parâmetros de qualidade de água, tais como: oxigênio dissolvido, temperatura e pH, avaliados duas vezes ao dia, e salinidade, medida uma vez ao dia (multiparâmetro YSI, modelo Professional Plus). A concentração de amônia total foi avaliada uma vez por semana de acordo com APHA (2005) e Strickland e Parsons (1984). Todos os parâmetros analisados se mantiveram em níveis adequados para o cultivo de *L. vannamei*, oxigênio dissolvido $5,3 \pm 0,2\text{ mg L}^{-1}$, temperatura $28,5 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH $8,0 \pm 0,4$, salinidade $34,0 \pm 1,0\text{ mg L}^{-1}$ e amônia total $0,6 \pm 0,05\text{ mg L}^{-1}\text{ N-NH}_3$.

2.4. Choque térmico

No 16° dia, 40 camarões de cada dieta (0,5% *S. filipendula* e controle) foram transferidos simultaneamente dos tanques com água salgada a $28,5 \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, para aquários de 60 L contendo água salgada a $11,5 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob aeração constante (em duplicata), e mantidos nestas condições por 1 h. Após este período, eles foram transferidos simultaneamente de volta para tanques com água salgada a $28,5 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, e a sobrevivência foi monitorada por 24 horas após choque térmico (h.a.c.t.). A água salgada usada durante todo choque térmico foi proveniente do mesmo reservatório, apresentando a mesma salinidade $34,20\text{ mg L}^{-1}$.

2.5. Coleta das amostras e análise de MALDI-TOF MS

As análises de MALDI-TOF MS foram realizadas em quatro grupos diferentes: animais controle antes do choque térmico (C), animais controle 15 min após choque térmico (C-CT), animais alimentados com 0,5% de *S. filipendula* antes do choque térmico (0,5S)

e animais alimentados com 0,5% *S. filipendula* 15 min após choque térmico (0,5S-CT). O processamento da hemolinfa foi feito como descrito por Kuhn-Nentwig et al. (2014) com pequenas modificações. Brevemente, amostras de hemolinfa de 200-250 μL foram coletadas individualmente de dez animais por tratamento usando solução tampão de amônia (0,45 M cloreto de amônia, 0,1 M glicose, 0,03 M citrato de amônia, 0,026 M ácido cítrico, 0,01 M EDTA, pH 4.6) contendo 0,010 M β -ciclodextrina (1:2 v/v) como anticoagulante. A hemolinfa foi então centrifugada a 1.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e os hemócitos foram ressuspensos em 100 μL de 0,1% ácido trifluoracético (TFA) em água.

Posteriormente, os hemócitos foram processados de duas formas diferentes. Primeiro, uma alíquota de 30 μL de hemócitos foi transferida para um microtubo separado, para análise de MALDI-TOF MS em células intactas. O restante dos hemócitos foi congelado e descongelado 3 vezes em nitrogênio líquido para lisar as células (Bodzon-Kulakowska et al., 2007). Entre cada ciclo de congelamento e descongelamento as amostras foram agitadas utilizando vortex para otimizar a lise celular. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a 20.800 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo.

Sobre uma placa de aço escovado para MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Germany), foram pipetados 0,5 μL das amostras de célula intacta ou sobrenadante do lisado celular e misturados com 0,5 μL da matriz ácido sinapínico (38 mg mL^{-1}) para análise de proteínas, ou a matriz 2,5-ácido dihidroxi-benzoico (20 mg mL^{-1}), diluída em 70:30 Acetonitrila:H₂O/0,2% TFA, para análise de lipídeos. As amostras foram depositadas em triplicata e deixadas secar a temperatura ambiente. Os espectros de massas foram adquiridos utilizando o Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com 200 Hz laser SmartBeam, e usando a função AutoXecute do FlexControl 3.3 acquisition software. Para análise de lipídeos, os espectros foram adquiridos no modo refletor positivo com intervalo de massa de m/z 500–1.000. Para análise de proteínas, os espectros foram adquiridos no modo linear positivo com intervalo de massa de m/z 2.000–20.000. Para cada amostra, 4.000 disparos de laser foram acumulados em 20 posições diferentes, escolhidas pelo modo de varredura aleatória.

Os espectros de massas das proteínas e lipídeos gerados, foram submetidos a calibragem externa e subtração da linha basal, usando o programa Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics). Para visualizar e comparar os espectros, bem como identificar os picos diferencialmente

modulados, foi gerado espectros médios usando ClinProTools 3.0 software (Bruker Daltonics).

Parâmetros diferentes de processamento do ClinProTools foram usados para análise dos perfis de proteínas e lipídeos, com base em Kang et al. (2011) e Munteanu et al. (2012). Para análise do perfil de lipídeos, os seguintes parâmetros foram usados: 500 de resolução; subtração da linha de base “top hat” com linha de base mínima de 20% de largura, e foi permitida a exclusão de espectros nulos. Para a recalibração dos espectros, foi permitida uma tolerância máxima de massa de 2.000 ppm e correspondência em 20% dos picos. Espectros não recalibrados foram excluídos. A seleção de picos foi realizada sobre o espectro médio utilizando $S/N > 5$, e para o cálculo de pico usou-se as intensidades e o tipo de integração nível zero. Para a análise do perfil de proteínas, os seguintes parâmetros foram usados: 800 de resolução; subtração da linha de base “top hat” com linha de base mínima de 10% de largura, e algoritmos de Savitsky–Golay para suavização (5 ciclos com m/z de 6 Da). Foi permitida a exclusão de espectros nulos e ruídos de espectro com limiar de ruído de 1,00. Para a recalibração dos espectros, foi permitida uma tolerância máxima de massa de 1.000 ppm e correspondência em 30% dos picos. Espectros não recalibrados foram excluídos. A seleção dos picos foi realizada sobre o espectro médio utilizando $S/N > 5$, e para o cálculo de pico usou-se as intensidades e o tipo de integração nível zero.

Para identificação dos lipídeos, foi feita análise de MALDI-TOF MS/MS (LIFT) dos picos de interesse. A partir dos dados do MALDI-TOF MS/MS juntamente com as informações da base de dados Lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>) foram feitas as confirmações dos tipos de lipídeos. Para proteínas, as massas de interesse foram apenas comparadas com as massas de proteínas descritas para diferentes espécies de camarões, presentes na base de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org>) e na literatura.

2.6. Análise de dados

Os dados de MALDI-TOF MS primeiramente foram submetidos a Análise dos Componentes Principais (PCA do inglês *Principal Component Analysis*), usando o software CPT, para identificar diferenças nos perfis de proteínas e lipídeos entre os tratamentos. Posteriormente, com a finalidade de verificar diferenças em cada pico de massa, os dados foram avaliados pelos testes Teste T/ANOVA (TTA) ou Wilcoxon/Kruskal-Wallis (WKW) de acordo com sua distribuição normal ou não-normal, respectivamente, avaliada pelo teste de

Anderson-Darling (PAD). Dados com distribuição normal (valor de p PAD $> 0,05$) foram submetidos a análise usando TTA e dados com distribuição não-normal (valor de p PAD $\leq 0,05$) foram submetidos a análise usando WKW. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos e $\leq 0,01$ altamente significativos.

3. Resultados

Os animais do grupo controle apresentaram maior mortalidade após o choque térmico (20%), quando comparado com os alimentados com 0,5% de *S. filipendula* (3%). Considerando os espectros médios de lipídeos e proteínas dos diferentes grupos, a análise de PCA revelou que os hemócitos dos camarões do tratamento 0,5S-CT apresentaram maior variação nos perfis de lipídeos (Fig.1 a,b) e de proteínas (Fig.2 a,b,c,d).

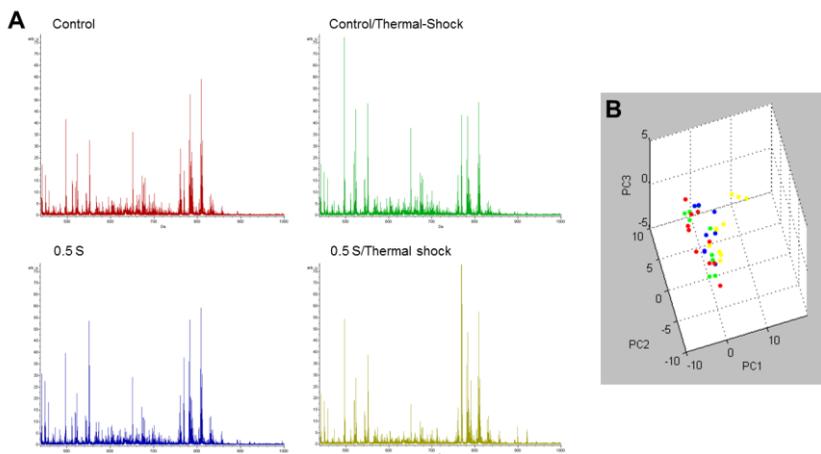


Fig. 3. (a) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de lipídeos do sobrenadante do lisado de hemócitos do camarão-branco-do-pacífico alimentado com dieta controle, sem suplementação, antes e 15 min depois do choque térmico (C e C-CT, respectivamente), e com dietas contendo 0,5% de *Sargassum filipendula*, antes e 15 min depois do choque térmico (0,5S e 0,5S-CT, respectivamente); (b) Diagrama da análise dos componentes principais dos perfis de lipídeos do sobrenadante do lisado de hemócitos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT).

A análise de MALDI-TOF MS do sobrenadante do lisado celular detectou 106 picos de lipídeos, variando de m/z 441,35 a 920,57. Os perfis de lipídeos das amostras de células intactas não puderam ser

analisados neste trabalho devido ao excessivo ruído de espectro de linha de base com o método utilizado. A análise estatística dos dados de MALDI-TOF MS identificou 35 picos diferentes significativamente ($p < 0,05$) entre os quatro grupos (Tabela 2). Por meio da análise de MALDI-TOF MS/MS, lipídeos foram identificados com base nas suas massas e nos seus padrões de fragmentação. Dentre os lipídeos significativamente modulados pelo choque térmico, 21 puderam ser identificados como múltiplas espécies de fosfatidilcolinas (PC) e lisofosfatidilcolinas (LPC). A maioria das espécies de LPC e PC identificadas continham cadeias de ácidos graxos insaturadas (Tabela 2).

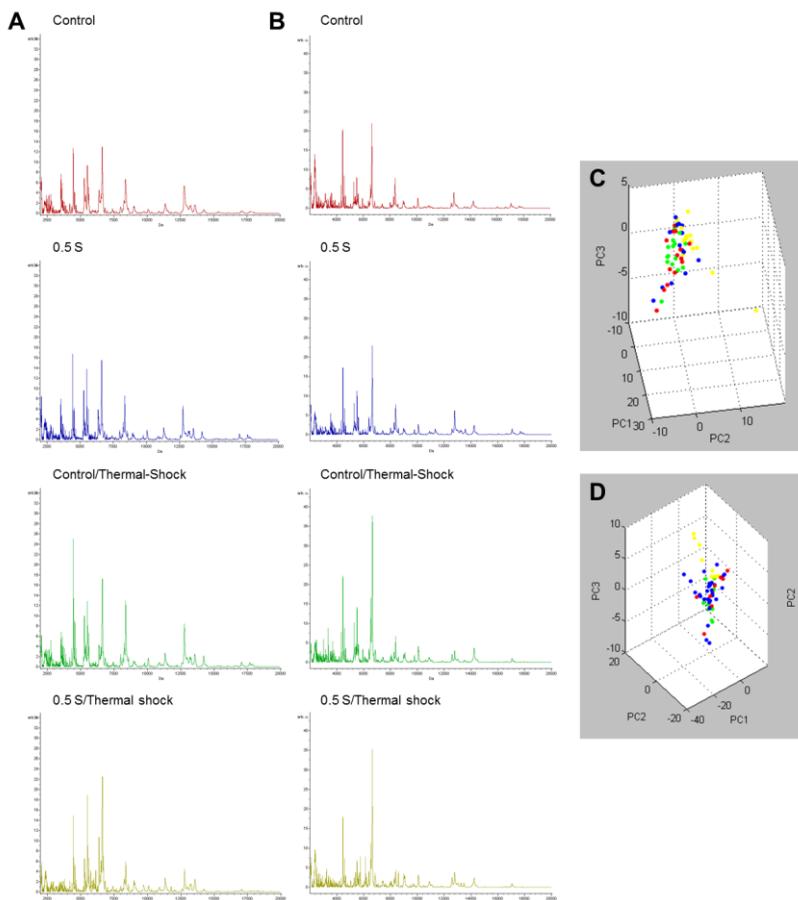


Fig. 4. (a) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de proteínas dos hemócitos intactos do camarão-branco-do-pacífico alimentado com dieta controle, sem suplementação, antes e 15 min depois do choque térmico (C e C-CT, respectivamente), e com dietas contendo 0,5% de *Sargassum filipendula*, antes e 15 min depois do choque térmico (0,5S e 0,5S-CT, respectivamente); (b) Espectro médio de massas por MALDI-TOF MS, referente ao perfil de proteínas do sobrenadante do lisado de hemócitos dos mesmos quatro tratamentos; (c) Diagrama da análise dos componentes principais dos perfis de proteínas dos hemócitos intactos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT); (d) Diagrama da análise dos componentes principais dos perfis de proteínas do sobrenadante do lisado de hemócitos dos quatro tratamentos (vermelho – C; verde – C-CT; azul – 0,5S; amarelo – 0,5S-CT).

Tabela 2 Dados do MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados nas amostras de sobrenadante de hemócitos lisados de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com a dieta controle e com 0,5% de *S. filipendula*, antes (C – controle; 0,5S – 0,5% *S. filipendula*) e após (C-CT - controle; 0,5S-CT – 0,5% *S. filipendula*) o choque térmico. Dados apresentados como a razão entre a intensidade do sinal após e antes o choque térmico (C-TS:C e 0,5S-TS:0,5S).

m/z	Identificação lipídeos		C-TS:C	0,5S-TS:0,5S	p*
468,43	-	-	1,22	0,71	0,0375
473,07	-	-	1,67	0,92	0,0357
511,05	-	-	0,64	0,54	0,0480
512,06	-	-	0,51	0,42	0,0375
534,07	-	-	0,54	0,48	0,0375
551,07	-	-	1,48	0,75	0,0375
570,38	-	-	1,09	0,82	0,0454
573,09	-	-	1,52	0,78	0,0332
580,43	LPC 20:5	M+K ⁺	0,96	0,53	0,0332
582,05	-	-	0,78	0,53	0,0443
602,39	LPC 22:0	M+Na ⁺	1,20	0,70	0,0332
606,41	-	-	1,07	0,54	0,0375
622,50	LPC 24:4	M+ Na ⁺	0,93	0,58	0,0443
636,53	LPC 26:0	M+ H ⁺	1,00	0,55	0,0443
648,57	LPC 26:5	M+ Na ⁺	1,07	0,63	0,0375
650,55	LPC 26:4	M+ Na ⁺	1,04	0,62	0,0375
660,37	-	-	0,90	0,79	0,0351
664,50	-	-	0,94	0,70	0,0375
666,50	LPC 27:3	M+ Na ⁺	0,88	0,58	0,0292
674,50	LPC 28:6	M+ Na ⁺	1,06	0,58	0,0332
676,53	LPC 28:5	M+ Na ⁺	1,18	0,64	0,0480
678,54	LPC 28:4	M+ Na ⁺	0,97	0,72	0,0375
686,51	LPC 28:0	M+ Na ⁺	0,96	0,68	0,0367
688,52	-	-	1,00	0,67	0,0292
690,50	-	-	1,04	0,67	0,0412
	PC				
694,56	28:3/LPC 29:3	M+ Na ⁺	0,76	0,65	0,0292
700,54	PC 28:0	M+ Na ⁺	1,13	0,73	0,0348
704,53	LPC 30:5	M+ Na ⁺	1,17	0,72	0,0292
706,51	LPC 30:4	M+ Na ⁺	1,02	0,77	0,0375
714,55	PC 29:1	M+ Na ⁺	1,00	0,73	0,0375
716,54	PC 29:0 (10:0/19:0)	M+ Na ⁺	1,08	0,74	0,0332
	PC 33:1				
768,58	(18:1/15:0 or 15:1/18:0)	M+ Na ⁺	2,27	4,00	0,0292
	PC 35:4				
790,52	(13:0/22:4)	M+ Na ⁺	1,78	3,92	0,0292
	PC 43:6				
898,58	(13:0/30:6)	M+ Na ⁺	1,68	3,97	0,0292
	PC 44:2				
920,57	(22:1/22:1)	M+ Na ⁺	1,34	3,83	0,0292

*Valor de p do teste TTA or WKW, dependendo da distribuição normal ou não-normal dos dados avaliada por PAD.

A Fig. 3 mostra um espectro de MS/MS típico de um PC com sódio (10:0/19:0). Os padrões de fragmentação de espécies de PC e LPC são similares, e apresentam as seguintes características: um sinal altamente abundante com m/z 183,8, referente à fosfocolina protonada; sinal menos abundante com m/z 86 referente à colina; perda neutra da trimetilamina (-59) a partir do fosfocolina (grupo cabeça); perda da fosfocolina inteiro (-183); e um pico com m/z 147 referente à fosfocolina com sódio após a perda neutra da trimetilamina (125+Na) (Schiller et al., 2004). Outros fragmentos estruturalmente relevantes apresentados na Fig. 3 são de menor abundância, e foram gerados pela perda das cadeias de ácidos graxos 10:0 (-171) e 19:0 (-297), m/z 545 e 419 respectivamente. A Fig. 4 apresenta os mesmos fragmentos de MS/MS típicos das espécies de PC e LPC com sódio, além da perda de um único ácido graxo 27:3 (-399), característico dos lisofosfolídeos.

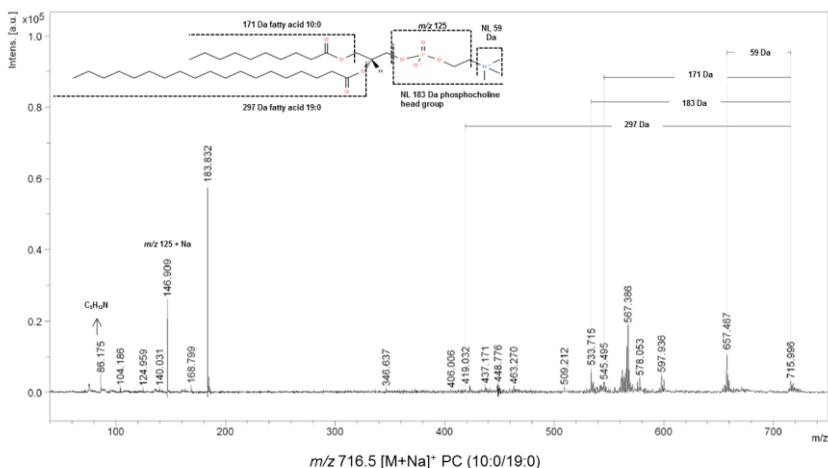


Fig. 3. Espectro de MALDI-TOF MS/MS da m/z 716,5, demonstrando fragmentos típicos utilizados para identificação como uma fosfatidilcolina PC 29:0 (10:0/19:0) com sódio.

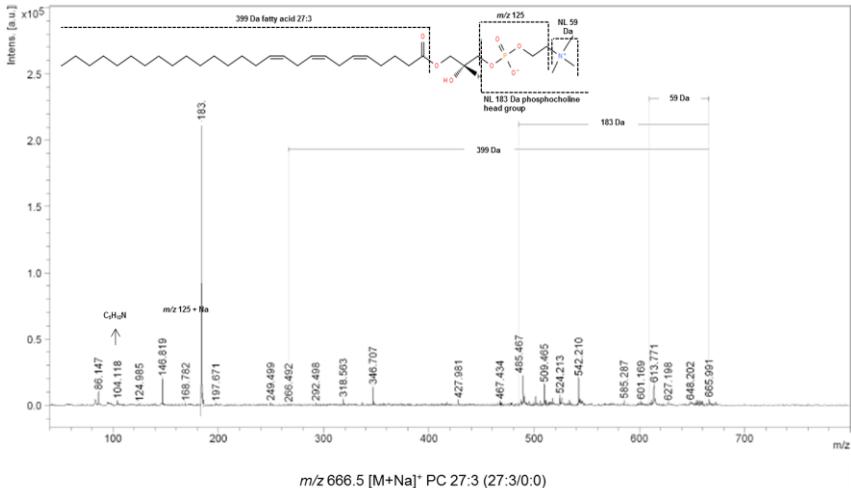


Fig. 4. Espectro de MALDI-TOF MS/MS da m/z 666,5, demonstrando fragmentos típicos utilizados para identificação como uma lisofosfatidilcolina LPC 27:3 com sódio.

Considerando o perfil de proteínas dos hemócitos, a análise de MALDI-TOF MS do sobrenadante do lisado celular detectou 105 picos de proteínas e das células intactas 89 picos, variando de m/z 2.015 a 18.251. A análise estatística dos dados de MALDI-TOF MS indicou que 9 e 37 picos foram diferencialmente modulados ($p < 0,05$) entre os quatro grupos nas amostras de células lisadas e intactas, respectivamente. Embora a identificação das proteínas não tenha sido realizada neste trabalho, foi possível associá-las com proteínas já descritas para camarões na base de dados UniprotKB e com dados relatados na literatura, baseando-se na massa molecular média das mesmas. A tabela 3 mostra as proteínas diferencialmente moduladas nos quatro tratamentos, para amostras de hemócitos intactos e sobrenadante de hemócitos lisados, com alto nível de significância ($p \leq 0,01$).

Tabela 3 Dados do MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas com alto nível de significância ($p \leq 0.01$) nas amostras de hemócitos intactos e sobrenadante de hemócitos lisados de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com a dieta controle e com 0,5% de *S. filipendula*, antes (C – controle; 0,5S – 0,5% *S. filipendula*) e após (C-TS – controle; 0,5S-TS – 0,5% *S. filipendula*) o choque térmico. Dados apresentados como a razão entre a intensidade do sinal após e antes o choque térmico (C-TS:C e 0,5S-TS:0,5S).

Hemócitos intactos			
m/z	C-TS:C	0,5S-TS:0,5S	p*
3.511	0,79	0,28	0,0006
3.605	0,85	0,32	0,0032
4.493	0,94	0,82	0,0056
5.737	1,16	3,04	0,0002
5.845	1,14	1,95	0,0032
5.958	1,14	2,68	0,0001
6.115	1,18	2,67	<0,0001
6.353	1,07	1,90	0,0020
8.365	1,49	0,70	0,0100
9.675	1,06	3,15	0,0007
10.905	1,51	1,46	0,0031
Sobrenadante de hemócitos lisados			
m/z	C-TS:C	0,5S-TS:0,5S	p*
3.606	0,55	0,45	0,0100
5.738	1,49	4,60	0,0100
5.916	1,06	0,26	0,0100
6.115	1,25	3,98	0,0100
13.233	0,90	2,22	0,0100

*Valor de p do teste TTA or WKW, dependendo da distribuição normal ou não-normal dos dados avaliada por PAD.

4. Discussão

O modo como os animais regulam o metabolismo dos lipídeos consiste em uma importante parte do mecanismo enantiostático em resposta ao estresse, tais como a flutuação de temperatura (Harpaz, 2005). Dentre os lipídeos diferencialmente modulados, foram identificados apenas diferentes tipos PCs e LPCs. No modo positivo, os PCs podem inibir a detecção de outras classes de fosfolipídeos como demonstrado em estudos prévios de MALDI-TOF MS usando misturas complexas de fosfolipídeos (Estrada e Yappert, 2004; Petkovic et al., 2001).

Todos os LPCs identificados demonstraram intensidade de sinal significativamente menor nos hemócitos dos camarões do tratamento

0,5S e menor ainda no 0,5S-CT, quando comparado aos grupos controle (Tabela 2). Os LPCs estão associados a diversos processos fisiológicos, como formação de fosfolípidos das membranas celulares, quimiotaxia de células “natural killers”, atração de monócitos por células apoptóticas (sinalização “find me”) e inibição da agregação plaquetária (Poon et al., 2014; Yamashita et al., 2014). LPCs são os lisofosfolípidos mais abundantes no plasma, e sua concentração no interior das células deve ser estritamente controlada devido a sua atividade citolítica (Yamashita et al., 2014). Li et al. (2016) demonstraram que em células endoteliais, os LPCs induzem a entrada de Ca^{2+} do citosol para mitocôndria, aumentando a síntese de ATP desacoplada e, conseqüentemente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez induz fatores de transcrição ligados à inflamação, como AP-1, levando a ativação das células endoteliais e atração de leucócitos. Além disso, os LPCs parecem estar envolvidos na indução da morte celular. Em hepatócitos de camundongo, LPCs causaram disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, induziram apoptose através da ativação das proteínas pró-apoptóticas PUMA e Bax (Kakisaka et al., 2012). Lee et al. (2016) identificaram o incremento de espécies de lisofosfolípidos, incluindo LPC, juntamente com a redução dos PCs, em células humanas leucêmicas sob morte celular autofágica, e sugeriram que a modulação desses tipos de lípidos tem um importante papel na apoptose. Portanto, a redução dos LPCs nos hemócitos de camarões alimentados com *S. filipendula* poderia estar relacionado com a formação de fosfolípidos da membrana (como os PCs), e /ou com a mitigação dos seus efeitos negativos no funcionamento celular, como a indução de estresse oxidativo e apoptose.

Por outro lado, os PCs com ácidos graxos insaturados tiveram maior intensidade de sinal ($p < 0,05$) nos hemócitos dos animais alimentados com 0,5% *S. filipendula* em relação ao grupo controle, e que aumentou ainda mais (4 vezes mais) após o choque térmico (Tabela 2). Quando comparado o tratamento 0,5S-CT e C-CT a intensidade do sinal dos PCs com ácidos graxos insaturados foi em torno 4 vezes maior no 0,5S-CT. Os PCs são importantes fosfolípidos das membranas celulares e podem atuar como precursor de diferentes moléculas de sinalização. Está bem estabelecido que ácidos graxos insaturados são incorporados aos fosfolípidos das membranas celulares quando em exposição ao frio, causando incremento na fluidez das membranas e modificações funcionais (Hayward et al., 2014; Pruitt, 1990; Schumann, 2016; Teets e Denlinger, 2013). O aumento da fluidez da membrana pelo incremento do grau de insaturação é um mecanismo comum em

diferentes organismos resistentes à variação térmica, tais como insetos que passam o inverno em diapausa, crustáceos, microorganismos e plantas resistentes ao frio (Córcoles-Sáez et al., 2016; Lee Jr. et al., 2006; Los e Murata, 2004; Malone et al., 2015; Pruitt, 1990; Takahashi et al., 2016).

Pruitt (1990) relatou ainda que a capacidade de ajustar a fluidez da membrana (adaptação da homeoviscosidade) para superar às condições térmicas é mais pronunciada em espécies de crustáceos que permanecem ativos em baixas temperaturas e, de fato, a incapacidade de ajustar a fluidez é um fator limitante para a amplitude térmica de atividade desses animais. Desta forma, os dados do presente trabalho indicam que o aumento da fluidez da membrana dos hemócitos dos camarões alimentados com 0,5% de *S. filipendula* após o choque térmico, pode desempenhar importante papel na resistência deles à variação de temperatura.

Diferentes faixas de massas de proteínas apresentaram comportamentos específicos dependendo do tratamento. Primeiro, pode-se destacar as proteínas dentro da faixa m/z 5.000-6.500, devido ao padrão de comportamento similar entre elas, exceto para m/z 5.916 na amostra de sobrenadante da lise dos hemócitos, as quais aumentaram após o choque térmico em ambos tratamentos, porém com mais intensidade no 0,5S-CT (Tabela 3). Cuthbertson et al. (2008) relataram que nessa faixa de massa, os íons mais predominantes detectados nos hemócitos de camarões são as penaeidinas. As penaeidinas constituem uma família diversa de peptídeos antimicrobianos descrita primeiramente no camarão-branco-do-pacífico. Esta família de peptídeos antimicrobianos possui atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de patógenos, tais como bactérias Gram + e -, fungos e vírus (Cuthbertson et al., 2008; Jeswin et al., 2013).

Analogamente, proteínas dentro da faixa m/z 8.365-10.905 mostraram um padrão similar ao das proteínas da faixa m/z 5.000-6.500, exceto pela m/z 8.365. Nessa faixa de massa, outros peptídeos antimicrobianos são encontrados, tais como as crustinas (7.000-14.000 kDa) e os fatores antilipopolisacarídeo (ALFs) (7.690-11.520 kDa). Juntamente com as penaeidinas, eles constituem os principais peptídeos antimicrobianos de camarões e mostram também amplo espectro de atividade (Rosa et al., 2013; Smith et al., 2008).

A intensidade de sinal da m/z 13.233 das amostras do sobrenadante de hemócitos lisados demonstrou um comportamento diferente dos picos de massas acima mencionados. Os animais alimentados com 0,5% *S. filipendula* apresentaram maior intensidade de

sinal em relação ao grupo controle, a qual se elevou ainda mais após o choque térmico. Nessa faixa de massa, Ouvry-Patat e Shey (2007) e Patat et al. (2004) identificaram diferentes histonas em hemócitos de *L. vannamei*, usando MALDI-TOF MS e outras técnicas, e determinaram que o sinal da histona H2A varia de m/z 13.193-13.277. Portanto, esses dados sugerem que a proteína relacionada ao pico m/z 13.233 pode ser uma histona H2A.

Existem diferentes tipos de proteínas histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4, que são primariamente envolvidas no enovelamento e regulação da transcrição do DNA (Hoeksema et al., 2016). Uma variedade de agentes estressores ambientais pode causar acúmulo e/ou modificações pós-traducionais nas histonas, as quais induzem a remodelagem da cromatina e, conseqüentemente, expressão gênica diferencial (Pawlak e Deckert, 2007). Pecinka e Scheid (2012) relataram que o estresse por temperatura causa modulação da histona H2A e suas variantes em plantas. Ademais, novas funções das histonas têm sido propostas, tais como atividade antimicrobiana, indução da inflamação e formação de armadilhas extracelulares de DNA por neutrófilos (Hoeksema et al., 2016).

Em camarões, Patat et al. (2004) mostraram que as histonas H2A, H2B e H4 possuem atividade antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas. Adicionalmente, os hemócitos de camarão também são capazes de formar armadilhas extracelulares de DNA, e histonas foram detectadas através de imunofluorescência nessas armadilhas de DNA, após estímulo com acetato forbol miristado (PMA), lipopolissacarídeo (LPS) e *Escherichia coli* viva, porém não foram observadas após estímulo com vírus da Mancha Branca (Koiwai et al., 2016; Ng et al., 2013).

Desta forma, os dados acima mencionados sugerem que o choque térmico afeta a capacidade antimicrobiana e regulação do DNA dos hemócitos dos camarões. No entanto, a adição de *S. filipendula* na dieta pareceu estimular esses mecanismos nos camarões até mesmo após o choque térmico, uma vez que a maioria das proteínas relacionadas mostraram maior intensidade de sinal quando comparado ao grupo controle.

Adicionalmente, os picos m/z 3.511, 3.605/3.606 (células intactas/sobrenadante do lisado celular, respectivamente) e 4.493 demonstraram um padrão de comportamento único. A intensidade do sinal dessas massas decresceu após o choque térmico em ambos tratamentos, no entanto, os camarões alimentados com *S. filipendula* apresentaram sinal menor do que os animais controle, antes e após o

choque térmico. Na base de dados UniprotKB, a maioria das proteínas nessa faixa de massas são associadas a subunidades de citocromo c oxidase de diferentes espécies de camarões. Citocromo c oxidase é uma enzima multimérica envolvida na produção aeróbica de energia na mitocôndria (Srinivasan e Avadhani, 2013). A atividade e expressão dessa proteína é consideravelmente diminuída sob condição de hipóxia e re-oxigenação, causando danos celulares durante o processo de re-oxigenação devido a ausência de aceptor final e, conseqüente aumento da produção de EROs (Li e Jackson, 2002). Durante o processo do choque térmico, os camarões podem ser submetidos à condição de hipóxia e re-oxigenação, uma vez que eles reduzem expressivamente suas atividades fisiológicas e metabolismo durante o ciclo de frio, e aumentam abruptamente quando retornam para água quente. Por outro lado, Hayward et al. (2014) declararam que a modulação da produção de energia em resposta ao frio apresenta aspectos comuns entre animais ectotérmicos. Notavelmente, eles reduzem a produção de energia aeróbica, levando a uma maior dependência das vias glicolítica e gliconeogênese (vias anaeróbicas). Esses dados sugerem que o choque térmico pode afetar a citocromo c oxidase pela imposição da condição de hipóxia e re-oxigenação, e/ou pela mudança no metabolismo celular a fim de produzir energia pela via anaeróbica.

As análises de MALDI-TOF MS foram sensíveis para determinar perfis de proteínas e lipídeos, e podem detectar padrões bioquímicos únicos em hemócitos de camarões submetidos a diferentes condições nutricionais ou de cultivo. Esta técnica constitui uma abordagem simples e de diagnóstico rápido para detectar variações bioquímicas. Entretanto, houve algumas limitações, como a identificação incompleta dos picos usando MS/MS e incapacidade de fragmentação das proteínas para auxiliar na identificação das mesmas. Portanto, melhorias devem ser feitas para otimizar a identificação dos lipídeos, e novas plataformas devem ser usadas em associação para possibilitar a identificação das proteínas.

5. Conclusão

A adição de 0,5% de *Sargassum filipendula* na dieta afetou expressivamente os perfis de proteínas e lipídeos dos hemócitos dos camarões, especialmente após o choque térmico. Os perfis moleculares apresentados neste trabalho estão de acordo com dados prévios utilizando diferentes plataformas de análise, e mostraram que a resistência de camarões alimentados com *S. filipendula* ao choque térmico pode estar associado ao aumento da fluidez da membrana e da

defesa antimicrobiana, à redução do estresse oxidativo e da apoptose, e à modulação diferencial do metabolismo energético e da regulação do DNA.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESC (termo de outorga: 2015TR303), CAPES e CNPq. Delano Dias Schleder recebeu bolsa da CAPES e licença para capacitação do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA). Agradecemos as bolsas de produtividade pagas pelo CNPq aos pesquisadores Felipe Vieira e Leila Hayashi.

Referências

- AOAC, Association of Official Analytical Chemists, 1999. Official Methods of Analysis, décima sexta ed. OMA, Arlington.
- APHA, American Public Health Association, 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, vigésima primeira ed. APHA Inc., Washington DC.
- Bodzon-Kulakowska, A., Bierczynska-Krzysik, A., Dylag, T., Drabik, A., Suder, P., Noga, M., Jarzebinska, J., Silberring, J., 2007. Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 15, 1-31.
- Chowanski, S., Lubawy, J., Spochacz, M., Paluch, E., Smykalla, G., Rosinski, G., Slocinska, M., 2015. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. *Comp. Biochem. Physiol. part A.* 183, 57-63.
- Cuthbertson, B.J., Deterding, L.J., Williams, J.G., Tomer, K.B., Etienne, K., Blacksheara, P.J., Büllesbache, E.E., Grosse, P.S., 2008. Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 167-181.
- Córcoles-Sáez, I., Hernández, M.L., Martínez-Rivas, J.M., Prieto, J.A., Rande-Gil, F., 2016. Characterization of the *S. cerevisiae* inp51 mutant links phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels with lipid content, membrane fluidity and cold growth. *Biochim. Biophys. Acta.* 1861, 213-226.
- Estrada, R., Yappert, M.C., 2004. Alternative approaches for the detection of various phospholipid classes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 39, 412-422.
- Fleurence, J., Moraçais, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., Jaouen, P., 2012. What are the prospects

- for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. Trends Food Sci. Tech. 27, 57-61.
- Harpaz, S., Becker, K., Blum, R., 1999. The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* - preliminary results. J. Therm. Biol. 24, 57-62.
- Harpaz, S., 2005. L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition-a review. Aquaculture. 249, 3– 21.
- Hayward, S.A.L., Manso, B., Cossins, A.R., 2014. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. J. Exp. Biol. 217, 6-15.
- Hoeksema, M., van Eijk, M., Haagsman, H.P., Hartshorn, K.L., 2016. Histones as mediators of host defense, inflammation and thrombosis. Future Microbiol. 11, 441-453.
- Jeswin, J., Anju, A., Thomas, P.C., Paulton, M.P., Vijayan, K.K., 2013. Survivability of *Penaeus monodon* during white spot syndrome virus infection and its correlation with immune related genes. Aquaculture. 380-383, 84-90.
- Kakisaka, K., Cazanave, S.C., Fingas, C.D., Guicciardi, M.E., Bronk, S.F., Werneburg, N.W., Mott, J.L., Gores, G.J. 2012. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 302, G77-G84.
- Kandasamy, S., Fan, D., Sangha, J.S., Khan, W., Evans, F., Critchley, A.T., Prithviraj, B. 2011. Tasco[®], a product of *Ascophyllum nodosum*, imparts thermal stress tolerance in *Caenorhabditis elegans*. Mar. Drugs. 9, 2256-2282.
- Kandasamy, S., Khan, W., Evans, F.D., Khan, W., Evans, F., Critchley, A.T., Prithviraj, B. 2014. A fucose containing polymer-rich fraction from the brown alga *Ascophyllum nodosum* mediates lifespan increase and thermal-tolerance in *Caenorhabditis elegans*, by differential effects on gene and protein expression. Food. Funct. 5, 275-284.
- Kang, H.S., Lee, S.C., Park, Y.S., Jeon, Y.E., Lee, J.H., Jung, S.Y., Park, I.H., Jang, S.H., Park, H.M., Yoo, C.W., Park, S.H., Han, S.Y., Kim, K.P., Kim, Y.H., Ro, J., Kim, H.K., 2011. Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype. Cancer. 11, 1-9.
- Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture. 191, 145-161.
- Koch, W.J., Sun, J., Jiang, X., Wang, H., Yang, X., 2016. Mitochondrial reactive oxygen species mediate lysophosphatidylcholine-induced

- endothelial cell activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1090-1100.
- Koiwai, K., Alenton, R.R.R., Kondo, H., Hirono, I., 2016. Extracellular trap formation in kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*) hemocytes is coupled with c-type lysozyme. *Fish Shellfish Immun.* 52, 206-209.
- Kuhn-Nentwig, L., Kopp, L.S., Nentwig, W., Haenni, B., Streitberger, K., Schürch, S., Schaller, J., 2014. Functional differentiation of spider hemocytes by light and transmission electron microscopy, and MALDI-MS-imaging. *Dev. Comp. Immunol.* 43, 59-67.
- Lee, J.W., Shinohara, H., Jung, J.H., Mok, H.J., Akao, Y., Kim, K.P., 2016. Detailed characterization of alterations in the lipid profiles during autophagic cell death of leukemia cells. *RSC Advances.* 35, 29512–29518.
- Lee Jr., R.E., Damodaran, K., Yi, S.X., Lorigan, G.A., 2006. Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology.* 52, 459-463.
- Li, C., Jackson, R.M., 2002. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C227–C241.
- Li, X., Fang, P., Li, Y., Kuo, Y.M., Andrews, A.J., Nanayakkara, G., Johnson, C., Fu, H., Shan, H., Du, F., Hoffman, N.E., Yu, D., Eguchi, S., Madesh, M., Koch, W.J., Sun, J., Jiang, X., Wang, H., Yang, X., 2016. Mitochondrial reactive oxygen species mediate lysophosphatidylcholine-induced endothelial cell activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, 1090-1100.
- Los, D.A., Murata, N., 2004 Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666, 142-157.
- Malone, A.M., Cozzi, R.R.F., Marshall, W.S., 2015. Cold acclimation allows regulation of chloride secretion in a eurythermic teleost fish *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol. part A.* 180, 68-74.
- Miyashita, K., Mikamia, N., Hosokawa, M., 2013. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids: A review. *J. Funct. Food.* 5, 1507-1517.
- Munteanu, B.L., von Reitzenstein, C., Hänsch, G.M., Meyer, B., Hopf, C., 2012. Sensitive, robust and automated protein analysis of cell differentiation and of primary human blood cells by intact cell MALDI mass spectrometry biotyping. *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2277-2286.
- Ng, T.H., Chang, S.H., Wu, M.H., Wang, H.C., 2013. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 41, 644-651.

- Ouvry-Patat, S.A., Schey, K.L., 2007. Characterization of antimicrobial histone sequences and posttranslational modifications by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 42, 664-674.
- Patat, S.A., Carnegie, R.B., Kingsbury, C., Gross, P.S., Chapman, R., Schey, K.L., 2004. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. *Eur. J. Biochem.* 271, 4825–4833.
- Pawlak, S., Deckert, J., 2007. Histone modifications under environmental stress. *Biological Lett.* 44, 65-73.
- Pecinka, A., Scheid, O.M., 2012. Stress-induced chromatin changes: a critical view on their heritability. *Plant Cell Physiol.* 53, 801-808.
- Peng, J., Wei, P., Chen, X., Zeng, D., Chen, X., 2016. Identification of cold responsive genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. *Gene.* 575, 667-674.
- Petkovic, M., Schiller, J., Muller, M., Benard, S., Reichl, S., Arnold, K., Arnhold, J., 2001. Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. *Anal. Biochem.* 289, 202-216.
- Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture.* 157, 107-115.
- Poon, I.K.H., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Ravichandran, K.S., 2014. Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature.* 14, 166-180.
- Pruitt, N.L., 1990. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J. Therm. Biol.* 15, 1-8.
- Richard, N., Silva, T.S., Wulff, T., Schrama, D., Dias, J.P., Rodrigues, P.M.L., Conceição, L.E.C., 2016. Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: Associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. *J. Proteomics.* 142, 1-14.
- Rosa, R.D., Vergnes, A., de Lorgeril, J., Goncalves, P., Perazzolo, L.M., Sauné, L., Romestand, B., Fievet, J., Gueguen, Y., Bachère, E., Destoumieux-Garzón, D., 2013. Functional divergence in shrimp anti-lipopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. *PLOSone.* 8, 1-11.
- Schiller, J.L., Süß, R., Arnhold, J., Fuchs, B., Lessig, J., Müller, M., Petkovic, M., Spalteholz, H., Zschörnig, O., Arnold, K., 2004. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF)

- mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog. Lipid Res.* 43, 449-88.
- Schleder, D.D., Rosa, J.R., Guimarães, A.M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Hayashi, L., Andreatta, E.R., 2017. Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *J. Appl. Phycol.* doi:10.1007/s10811-017-1129-z.
- Schumann, J., 2016. It is all about fluidity: Fatty acids and macrophage phagocytosis. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 1 8–23.
- Smith, V.J., Fernandes, J.M.O., Kemp, G.D., Hauton, C., 2008. Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* 32, 758-772.
- Srinivasan, S., Avadhani, N.G., 2013. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 53, 1252-1263.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1984. A practical handbook of seawater analysis (Bulletin 167), second ed. Unipub, Ottawa.
- Takahashi, D., Imai, H., Kawamura, Y., Uemura, M., 2016. Lipid profiles of detergent resistant fractions of the plasma membrane in oat and rye in association with cold acclimation and freezing tolerance. *Cryobiology.* 72, 123-134.
- Teets, N.M., Denlinger, D.L., 2013. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. *Physiol. Entomol.* 38, 105-116.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J., 2016. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture.* 464, 529-536.
- Yamashita, A., Hayashi, Y., Nemoto-Sasaki, Y., Ito, M., Oka, S., Tanikawa, T., Waku, K., Sugiura, T., 2014. Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog. Lipid. Res.* 53, 18-81.
- Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819-2830.

Capítulo 4

Efeito da adição de diferentes níveis de algas pardas na dieta sobre o desempenho zootécnico, histologia do trato digestivo, atividade de enzimas digestivas e resistência ao desafio com vírus da Mancha Branca do camarão-branco-do-pacífico

RESUMO

No presente trabalho foi avaliado o desempenho zootécnico, histologia do intestino, atividade das enzimas digestivas e a resistência ao desafio com vírus da Mancha Branca (WSSV) do camarão *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% das algas pardas *Undaria pinnatifida* e *Sargassum filipendula*. Os camarões foram cultivados em água clara por 5 semanas em tanques de 800 L com 40 camarões ($4,23 \pm 0,15$ g), em triplicata, sob aeração e temperatura ($29,06 \pm 0,32$ °C) constantes, e 100% de renovação diária de água. Os animais foram alimentados cinco vezes ao dia, com base no método de conversão programada, e semanalmente foram realizadas biometrias totais para avaliar o crescimento. Ao fim do experimento, foram coletados hepatopâncreas de seis animais por tratamento para analisar a atividade das enzimas digestivas e o segmento anterior do abdômen de quatro animais por tratamento para histologia. Adicionalmente, 40 animais por tratamento foram infectados com WSSV, e a mortalidade foi monitorada por 72 h. Não houve diferença significativa entre os tratamentos nos parâmetros zootécnicos avaliados. A adição da biomassa seca de 4% de *U. pinnatifida* na dieta causaram redução da mortalidade cumulativa dos camarões (48%) após o desafio com WSSV, quando comparado ao controle (74%). Os níveis de 0,5% de ambas as algas pardas causaram o aumento da superfície do epitélio de absorção de nutrientes no intestino dos camarões, e os diferentes níveis das algas provocaram aumento da atividade enzimática da amilase, enquanto a lipase foi estimulada apenas com a adição de 4% de *U. pinnatifida*. A adição das algas na ração não afetou a atividade das enzimas proteolíticas, tripsina e quimotripsina. O presente trabalho demonstrou que algas pardas como aditivo alimentar melhoraram a fisiologia digestiva e a resistência dos camarões frente ao WSSV, sem afetar o desempenho zootécnico.

Palavras-chave: *Sargassum filipendula*, *Undaria pinnatifida*, Camarão, Desempenho zootécnico, Digestão, Mancha Branca

ABSTRACT

This work aimed to evaluate growth performance, gut histology, digestive enzymes activity and resistance to challenge with White Spot Syndrome Virus (WSSV) of *Litopenaeus vannamei* fed 0.5, 2 and 4% of the brown seaweeds *Sargassum filipendula* and *Undaria pinnatifida*. Shrimp (4.23 ± 0.15 g) were reared during 5 weeks in 800 L tanks (40 shrimps per tank) in triplicate, under constant aeration and temperature (29.06 ± 0.32 °C), 100% of daily water exchange. Animals were fed five times day⁻¹ and the amount of feed were calculated considering pre-established feed conversion rate method. To estimate survival and growth all animals from each tank were weighted and counted every week. At the end of the experiment, we collected hepatopancreas from six shrimp per treatment to assess the digestive enzymes, and the anterior abdominal segment from four shrimp per treatment to evaluate the gut histology. Fourty animals were challenged with WSSV and kept for 72 h to estimate the mortality. Growth performance were not affected by seaweed supplementation. However, the lowest level of both seaweeds increased the surface of gut absorption epithelium of the shrimps, and all levels of *S. filipendula* and 4% of *U. pinnatifida* augmented the amylase activity, while lipase activity were only stimulated by 4% of *U. pinnatifida*. Proteolytic enzymes were not affected by seaweed supplementation. Additionally, 4% of *U. pinnatifida* caused lower mortalities after WSSV challenge (48%) compared to control (74%). Therefore, seaweed supplementation improved shrimp digestive capacity and resistance to WSSV challenge, without imparing growth performance.

Keywords: *Sargassum filipendula*, *Undaria pinnatifida*, Shrimp, Growth, Digestion, White Spot Disease

DESTAQUES

Camarões alimentados com o nível 0,5% de ambas as espécies apresentaram aumento da superfície do epitélio de absorção de nutrientes no intestino;

A adição de todos os níveis de *S. filipendula* aumentaram a atividade da enzima amilase;

O nível de adição de 4% de *U. pinnatifida* aumentou a atividade da amilase, lipase total e a resistência dos camarões ao desafio com WSSV;

A adição da biomassa seca das macroalgas na dieta causaram diversos efeitos fisiológicos benéficos sem afetar o desempenho zootécnico dos camarões.

1. Introdução

Segundo a FAO (2016), o impacto das enfermidades na produção mundial de camarões é alarmante. No Brasil, a produção de camarões tem sofrido declínios expressivos nos últimos anos devido às enfermidades, em especial a Doença da Mancha Branca (WSD). Em Santa Catarina, no Sul do Brasil, esta doença reduziu drasticamente a produção camaroneira de 4.189 toneladas em 2004 para apenas 75 toneladas em 2014, provocando a quase extinção da Carcinicultura no estado. Além disso, desde de 2010 essa doença tem atingido diferentes estados da região nordeste, principal região produtora do país, causando quedas expressivas da produção (Borba e Nogueira, 2013; Carvalho-Filho, 2014; Costa et al., 2010).

Neste sentido, diversos esforços têm sido realizados para desenvolver produtos ou métodos de tratamento e/ou prevenção de enfermidades em camarões marinhos. Dentre as estratégias desenvolvidas para combater enfermidades pode-se destacar o desenvolvimento de práticas e técnicas de cultivo biosseguras (Flegel, 2012), métodos de vacinação alternativos (vacina de proteínas recombinantes, vacina de DNA/RNA e RNA de interferência), e a utilização de prebióticos, probióticos e aditivos alimentares, tais como componentes da parede celular de fungos, sais orgânicos, extrato de plantas, micro e macroalgas (Musthaq e Kwang, 2011; Verbruggen et al., 2016). Diversos estudos têm demonstrado resultados promissores na prevenção de enfermidades de camarões utilizando extratos ou componentes isolados de plantas e algas (Chakraborty et al., 2014; Huynh et al., 2011; Immanuel et al., 2012; Tomazelli Jr. et al., 2017).

Neste sentido, há um crescente interesse na utilização de macroalgas como aditivo alimentar para camarões marinhos, devido as suas propriedades nutricionais, imunomoduladoras, antivirais, antibacterianas e promotoras de crescimento, que são decorrentes da abundância e complexidade de compostos bioativos que estes organismos apresentam (Cruz-Suárez et al., 2008; Fleurence et al., 2012; Milledge et al., 2016; Pádua et al., 2015; Sanjeewa et al., 2016). Além disso, a utilização de macroalgas como aditivo alimentar constituem medida profilática com elevada viabilidade, devido ao baixo custo e facilidade de aplicação.

Em trabalho anterior, camarões alimentados com 4% da biomassa seca da alga parda *Undaria pinnatifida* causou aumento da atividade da enzima fenoloxidase, ligada à resposta imune, e reduziu a contagem de *Vibrio* spp. no trato digestivo. Já os animais alimentados com 0,5 e 2% da biomassa seca da alga parda *Sargassum filipendula* apresentaram significativo aumento na resistência contra variação térmica que, por sua vez, constitui um importante fator de estresse para os camarões, servindo como mecanismo desencadeador de surtos de enfermidades (Kautsky et al., 2000; Schleder et al., 2017). Frente ao exposto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros zootécnicos, histologia do trato digestório, atividade de enzimas digestivas e a resistência à infecção com vírus da Mancha Branca de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dietas contendo 0,5, 2 e 4% da biomassa seca das algas *U. pinnatifida* e *S. filipendula*.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais

Foram utilizados camarões da espécie *L. vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE HB12, adquirida da empresa Aquatec Aquacultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brazil). Após a larvicultura, as pós-larvas (PLs) foram transferidas para tanques de 50 ton a uma densidade de estocagem de 2000 PLs m⁻³ (fase de berçário) e cultivados em sistema de bioflocos até atingirem 4,23 ± 0,15 g. Após a transferência para os tanques experimentais, os camarões foram aclimatados à nova condição por 8 h sem alimentação.

2.2. Biomassa seca das macroalgas e produção das dietas

A biomassa seca das macroalgas e as dietas utilizadas no presente experimento foram as mesmas utilizadas por Schleder et al. (2017). Foram utilizadas 7 dietas, 6 dietas experimentais e uma controle. Nas dietas experimentais foi adicionado 0,5, 2 e 4% de cada macroalga (*L.*

vannamei e *U. pinnatifida*), em substituição ao caulim, enquanto a dieta controle possuía a mesma formulação, porém sem adição das macroalgas. A formulação e a composição centesimal das dietas estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	C	<i>S. filipendula</i> (%)			<i>U. pinnatifida</i> (%)		
		0,5	2,0	4,0	0,5	2,0	4,0
Farinha de resíduo de salmão (640 g kg ⁻¹ PB)	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0	220,0
Farelo de soja (450 g kg ⁻¹ PB)	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0	370,0
Farinha de trigo	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0	150,0
Óleo de fígado de bacalhau	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0	35,0
Óleo de soja	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Lecitina de soja	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Premix vitamínico ^a	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
Premix mineral ^a	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2	16,2
Fosfato monocálcico	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Cloreto de sódio	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5	11,5
Cloreto de potássio	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Sulfato de magnésio	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0	15,0
Vitamina C ^b	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Carboximetilcelulose	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Caulim	102,8	97,8	82,8	62,8	97,8	82,8	62,8
<i>S. filipendula</i> (biomassa seca)	0,0	5,0	20,0	40,0	0,0	0,0	0,0
<i>U. pinnatifida</i> (biomassa seca)	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0	20,0	40,0
Composição centesimal (g kg ⁻¹)							
Umidade	112,9	117,2	105,4	98,2	111,6	107,5	106,4
Proteína bruta	330,5	323,6	331,7	328,9	329,3	327,1	328,7
Extrato etéreo	73,4	70,0	64,3	68,4	67,3	68,8	69,9
Cinzas	182,4	175,6	172,9	166,0	180,2	172,6	166,2
Energia bruta ^c	3.667	3.692	3.672	3.776	3.664	3.689	3.787

^a – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil); vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D₃ - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K₃ - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹; cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹. ^b – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil); ^c – cal g⁻¹. PB: proteína bruta.

2.3. Condições experimentais

Os camarões foram distribuídos em 21 tanques de 800 L (triplicata) contendo água salgada (temperatura $28,5 \pm 1,5$ °C, salinidade $34,1 \pm 0,1$ mg L⁻¹), a uma densidade de 50 camarões m⁻³ (40 animais tanque⁻¹) em delineamento totalmente ao acaso. O experimento teve duração de cinco semanas, durante o qual os animais foram alimentados cinco vezes ao dia de acordo com o tratamento, e a quantidade diária de ração fornecida foi calculada com base no método de conversão programada. Semanalmente foram realizadas biometrias totais e ao fim do experimento foi calculado conversão alimentar, ganho em peso semanal, peso final e sobrevivência.

Ao longo do cultivo, a água dos tanques foi renovada 100% diariamente, a fim de retirar os restos de alimento, fezes e mudas. Adicionalmente, foram monitorados os principais parâmetros de qualidade de água, tais como: oxigênio dissolvido e temperatura, avaliados duas vezes ao dia, pH e salinidade uma vez ao dia (multiparâmetro YSI, modelo Professional Plus), e alcalinidade, amônia total e nitrito uma vez por semana de acordo com Strickland e Parsons (1984) e APHA (1995). Todos os parâmetros avaliados se mantiveram em níveis adequados para o cultivo de *L. vannamei*, oxigênio dissolvido $5,89 \pm 0,07$ mg L⁻¹, temperatura $29,06 \pm 0,32$ °C, pH $8,19 \pm 0,04$, salinidade $34,64 \pm 0,03$ mg L⁻¹, alcalinidade $129,00 \pm 6,30$ mg L⁻¹ CaCO₃, amônia total $0,30 \pm 0,18$ mg L⁻¹ N-NH₃ e nitrito $0,0029 \pm 0,0001$ mg L⁻¹ N-NO₂

2.4. Histologia do trato digestório

Após o período de cultivo, foi retirado um fragmento transversal (1 cm) na região do segundo segmento do abdômen de quatro camarões por tratamento (1-2 por tanque), e os fragmentos foram fixados em solução de Davidson por 24 h. Posteriormente, foi realizado o procedimento padrão para histologia: desidratação, diafanização, parafinização e inclusão em parafina. Os blocos foram cortados com auxílio de um micrótomo manual na espessura de 4 µm e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas coradas foram analisadas em microscópio (ZEISS, Axio Imager A.2, Gottingen, Germany) acoplado ao sistema de fotodocumentação (Canon, powershot G9). A partir das fotografias, foi realizada a mensuração do perímetro externo e da mucosa interna (epitélio de absorção) dos intestinos, a fim de estabelecer a relação do perímetro interno (pi) / externo (pe).

2.5. Atividade enzimática

Ao final do cultivo foram coletados seis animais de cada tratamento (2 por tanque) e congelados imediatamente a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, foi extraído o hepatopâncreas de cada animal e colocado individualmente em 2 mL de água ultrapura, homogeneizados com o homogeneizador Potter-Ekvehjem sob refrigeração em gelo, centrifugados a $15.000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 20 min, e o sobrenadante (extrato enzimático) transferido para microtubos. Os extratos enzimáticos foram diluídos conforme a análise: para a atividade da tripsina as amostras foram diluídas 200 x, para quimotripsina 400 x, para amilase 200 x e para lipase total 40 x em água bidestilada.

A atividade de tripsina foi determinada utilizando o substrato N-Benzoil-DL-Arginil p-nitroanilida (bz-R-pNA) e a atividade de quimotripsina o N-Succinil-Ala-Ala-Pro-Leu p-nitroanilida (suc-AAPL-4-pNA), ambos dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 2 mM e diluída 1:1 (v/v) em tampão fosfato 100 mM, pH 7,5 (concentração final 1 mM). Para análise da atividade enzimática da tripsina e quimotripsina foram misturados 50 μL de extrato enzimático (em triplicata) com 50 μL de substrato tampão (1:1, v/v), e as leituras de absorbância (410 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) a cada 15 minutos de incubação a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. As atividades de tripsina e quimotripsina foram calculadas em unidades (U), que equivale a 1 μmol de p-NA formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de p-NA. No controle negativo, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

Atividade da amilase foi determinada através da reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) com grupos redutores dos carboidratos. Como substrato foi utilizado uma solução de amido a 2% em solução tampão (100 mM acetato de sódio, pH 6,5). Durante a reação foram misturados 25 μL do extrato enzimático (em triplicata) e 25 μL de substrato, e incubados em banho-maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 h. A reação foi parada a cada 15 min adicionando 100 μL de DNS. Ao final deste período, os tubos foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria com água a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min. Em seguida, foram adicionados 100 μL de água bidestilada em cada tubo, e após homogeneização foram transferidos 150 μL de cada tubo para uma placa de 96 poços com fundo chato. As leituras de absorbância (550 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite Pro., California, USA) e a atividade da amilase foi calculada em unidades

(U), que equivale a 1 μmol de glicose formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão de glicose. Como controle, o extrato enzimático foi substituído por água bidestilada.

Para a atividade de lipase total foi utilizado como substrato metil umbeliferil oleato em acetonitrila ($0,9 \text{ mg mL}^{-1}$). Durante o ensaio, foram adicionados 50 μL do substrato e 50 μL do extrato enzimático (em triplicata), e as leituras de fluorescência (excitação 355 nm, emissão 460 nm) foram realizadas em leitor de microplacas TECAN (Infinite M200, California, USA) a cada 2 min de incubação a 30 °C por 20 min. A atividade de lipase total foi determinada em unidades (U), que equivale a 1 μmol de metil umbeliferona formado por minuto, determinadas a partir da curva padrão. Foram feitos controles sem extrato enzimático e sem os substratos.

2.6. Desafio com Vírus da Mancha Branca (WSSV)

Ao final do cultivo, 40 camarões por tratamento (10-15 por tanque) foram transferidos para o Laboratório de Bioensaios do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA), e acondicionados em caixas de 60 L contendo água salgada (30 mg L^{-1}) a 28 °C para aclimatação por 48 h. Após a aclimatação, os camarões ($13,0 \pm 0,15$) foram infectados oralmente via gavagem com aproximadamente 220 μL por animal (17 μL por grama) de inóculo de WSSV com carga viral de $3,7 \times 10^8 \text{ } \mu\text{L}^{-1}$. Um grupo controle WSSV-negativo foi feito fornecendo pela mesma via um inóculo produzido a partir de camarões SPF livres de WSSV na mesma proporção (17 μL por grama). Durante 72 horas pós-infecção (h.p.i.) foi avaliada a mortalidade cumulativa dos animais.

Para produção do inóculo viral, primeiro o material infectante armazenado em nitrogênio líquido no Instituto Federal Catarinense, campus Araquari (IFCCA) foi reativado. Para isto, 50 μL foi inoculado em animais SPF sadios (livres de WSSV, IMNV e IHHNV). Aos primeiros sinais de doença, os animais foram sacrificados, triturados mecanicamente e homogeneizados em solução tampão (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) (1:10 p/v), e em seguida, centrifugados a 2000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 9000 x g por 10 minutos a 4 °C, filtrado (0,45 μm) e conservado em nitrogênio líquido (conforme Lehmann et al., 2016). A presença do vírus da mancha branca no inóculo experimental foi confirmada por PCR (kit Concepto Azul®).

2.7. Análises estatísticas

Os dados de desempenho zootécnico, histologia do trato digestivo e atividade enzimática foram primeiramente avaliados quanto à homoscedasticidade e normalidade através dos testes Levene e Shapiro–Wilk, respectivamente. Quando considerados paramétricos, foram submetidos à análise de variância unifatorial (ANOVA one way) seguido pelo teste de Tukey, e quando considerados não paramétricos foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis. Os dados de sobrevivência ao desafio com Mancha Branca foram analisados por Kaplan-Meier. Todos os testes estatísticos foram realizados no programa Statistica 10 (StatSoft®), utilizando o nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Desempenho zootécnico

Ao final do período experimental, constatou-se que os camarões apresentaram elevados índices de desempenho zootécnico, entretanto não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em nenhum parâmetro zootécnico avaliado (Tabela 2).

Tabela 2 Desempenho zootécnico de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida*.

	Controle	Tratamentos								p	
		<i>S. filipendula</i> (%)		<i>U. pinnatifida</i> (%)		<i>S. filipendula</i> (%)		<i>U. pinnatifida</i> (%)			
		0,5	2	4	0,5	2	4	0,5	2	4	
Ganho de peso semanal (g)	1,71 ± 0,29	1,74 ± 0,28	1,75 ± 0,31	1,78 ± 0,30	1,74 ± 0,30	1,77 ± 0,28	1,74 ± 0,26	1,74 ± 0,30	1,77 ± 0,28	1,74 ± 0,26	0,7025
Peso final (g)	12,80 ± 0,26	12,99 ± 0,32	12,85 ± 0,31	13,26 ± 0,36	12,91 ± 0,20	13,07 ± 0,16	12,93 ± 0,37	12,91 ± 0,20	13,07 ± 0,16	12,93 ± 0,37	0,5586
Sobrevivência (%)	95,83 ± 1,44	99,17 ± 1,44	97,50 ± 3,82	98,33 ± 2,89	96,67 ± 3,82	97,50 ± 3,82	96,67 ± 2,89	96,67 ± 3,82	97,50 ± 3,82	96,67 ± 2,89	0,8395
Conversão alimentar	1,88 ± 0,21	1,83 ± 0,21	1,80 ± 0,16	1,78 ± 0,22	1,88 ± 0,21	1,80 ± 0,19	1,83 ± 0,18	1,88 ± 0,21	1,80 ± 0,19	1,83 ± 0,18	0,2518

3.2. Histologia do trato digestório

A adição de 0,5% de ambas as espécies de algas na ração causou aumento significativo ($p < 0,05$) da superfície do epitélio de absorção em relação ao controle e os demais tratamentos (Tabela 3; Fig. 1.).

Tabela 2 Razão do perímetro interno (PI) de epitélio de absorção e do perímetro externo (PE) do intestino médio em micrômetros de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (U).

Trat.	Relação pi/pe*
Controle	$0,92 \pm 0,11^a$
0,5U	$1,15 \pm 0,10^b$
2U	$0,98 \pm 0,02^{ab}$
4U	$1,12 \pm 0,13^{ab}$
0,5S	$1,08 \pm 0,05^b$
2S	$0,95 \pm 0,03^{ab}$
4S	$0,99 \pm 0,04^{ab}$

* relação do perímetro interno (pi) / externo (pe)

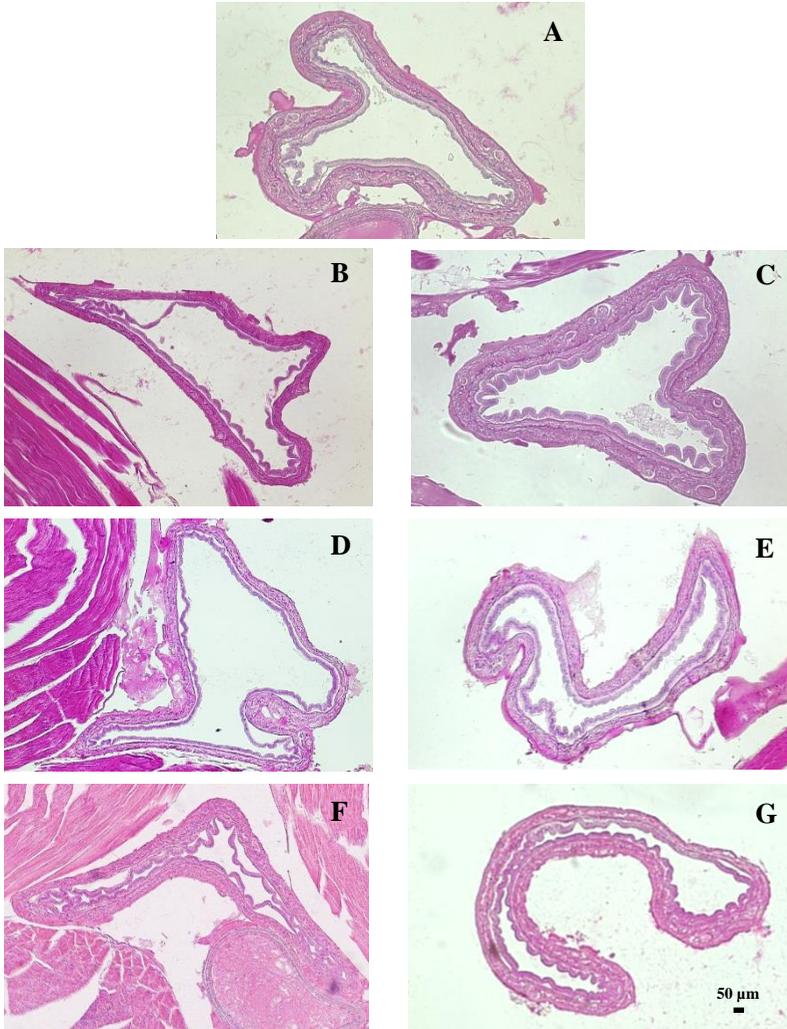


Fig. 1. Fotomicrografia do intestino de *Litopenaeus vannamei* alimentado com dietas contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (B, D e F, respectivamente), 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida*, (C, E e G, respectivamente) e dieta controle, sem suplementação (A).

3.3. Atividade enzimática

Não houve diferença significativa entre os tratamentos na atividade absoluta das enzimas quimotripsina e tripsina, entretanto, a atividade específica dessas enzimas foi menor ($p < 0,05$) nos grupos alimentados com os diferentes níveis de *S. filipendula* e com 4% de *U. pinnatifida*. No entanto, essa redução na atividade específica ocorreu devido ao incremento significativo ($p < 0,05$) da concentração proteica do hepatopâncreas dos animais destes tratamentos. Por outro lado, a atividade absoluta da amilase aumentou nos grupos 0,5S, 2S, 4S, 2U e 4U em relação ao controle, porém apenas os grupos alimentados com a *S. filipendula* apresentaram aumento significativo da atividade específica dessa enzima ($p < 0,05$). Já a atividade absoluta e específica da lipase total foi maior ($p < 0,05$) nos animais do tratamento 4U em relação aos demais grupos (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade enzimática absoluta (AA) e específica (AE) do hepatopâncreas de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta controle e com adição de 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (U).

Trat.	Amilase		Lipase		Tripsina		Quimotripsina		Concentração proteica ³
	AA ¹	AE ²	AA	AE	AA	AE	AA	AE	
Controle	201,6 ±73,0 ^a	10,1 ±5,4 ^a	322,5 ±58,9 ^b	16,6 ±4,5 ^b	43,8 ±3,5 ^a	2,1 ±0,3 ^a	129,0 ±10,7 ^a	7,2 ±1,4 ^a	9,0±1,5 ^a
0,5U	264,0 ±52,5 ^a	11,9 ±2,9 ^a	192,6 ±61,2 ^c	8,4 ±2,6 ^{bc}	41,8 ±4,4 ^a	1,9 ±0,7 ^{ab}	129,6 ±12,5 ^a	4,0 ±0,6 ^b	10,6±2,3 ^a
2U	356,7 ±67,6 ^{ab}	14,9 ±2,7 ^a	279,5 ±64,1 ^c	11,4 ±1,6 ^{bc}	39,9 ±4,9 ^a	1,7 ±0,2 ^{ab}	134,8 ±16,0 ^a	5,7 ±0,8 ^a	10,5±2,4 ^a
4U	660,8 ±305,5 ^b	17,3 ±5,8 ^a	916,7 ±170,2 ^a	27,4 ±9,0 ^a	42,5 ±3,0 ^a	1,3 ±0,3 ^b	139,2 ±11,6 ^a	6,0 ±1,5 ^a	15,1±5,5 ^b
0,5S	994,8 ±81,9 ^c	30,2 ±3,8 ^b	249,8 ±64,0 ^c	7,9 ±1,8 ^c	43,1 ±2,0 ^a	1,3 ±0,1 ^b	140,7 ±13,7 ^a	4,3 ±0,4 ^b	16,7±2,0 ^b
2S	844,8 ±185,6 ^{bc}	26,1 ±2,9 ^b	283,6 ±44,6 ^c	8,4 ±1,2 ^c	40,1 ±4,7 ^a	1,2 ±0,2 ^b	142,2 ±14,8 ^a	4,2 ±0,6 ^b	18,0±4,0 ^b
4S	925,3 ±150,8 ^{bc}	28,6 ±4,7 ^b	423,0 ±35,6 ^b	13,4 ±3,0 ^{bc}	41,2 ±2,4 ^a	1,3 ±0,2 ^b	136,7 ±13,3 ^a	4,2 ±0,5 ^b	17,4±3,9 ^b

¹U animal⁻¹; ²U mg de proteína do hepatopâncreas⁻¹; ³mg mL⁻¹

3.4. Desafio com Vírus da Mancha Branca (WSSV)

O maior nível de *U. pinnatifida* reduziu 26% da mortalidade dos camarões após 72 h de infecção quando comparado com o tratamento controle. A mortalidade cumulativa dos demais tratamentos não foi significativamente diferente do grupo controle (Fig. 2.).

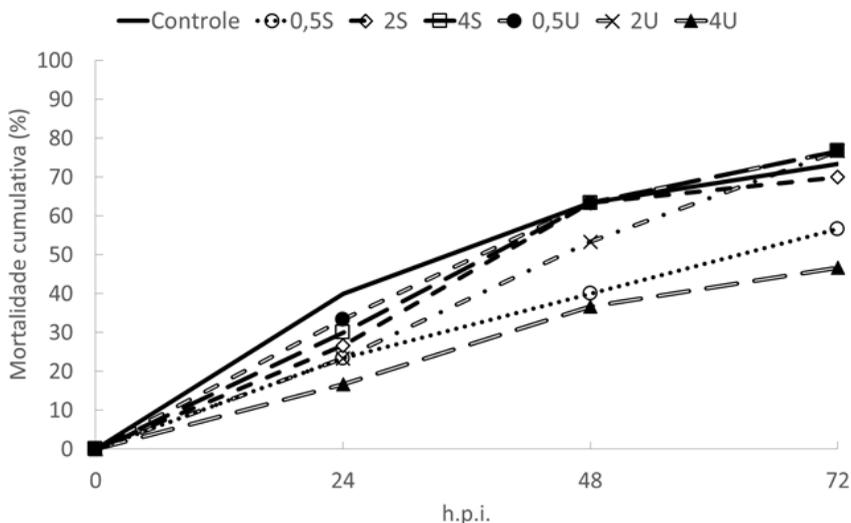


Fig. 2. Mortalidade cumulativa de camarões-brancos-do-pacífico alimentados com dieta contendo 0,5, 2 e 4% de *Sargassum filipendula* (0,5S, 2S e 4S) e 0,5, 2 e 4% de *Undaria pinnatifida* (0,5U, 2U e 4U) e dieta controle (sem adição) após 72 horas pós-infecção (h.p.i.) com vírus da Mancha Branca. Houve diferença significativa na mortalidade do tratamentos 4U ($p=0,043$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença ($p>0,15$) entre os demais tratamentos e o grupo controle.

4. Discussão

A aplicação das macroalgas na nutrição animal é uma tendência crescente nas últimas décadas, devido, em grande parte, as suas propriedades nutricionais e funcionais, as quais abrangem a promoção do crescimento, ao aumento da absorção de nutrientes, à imunomodulação, à melhora na resposta ao estresse e às enfermidades. Além disso, a utilização da biomassa seca ou de extratos das macroalgas constitui uma abordagem mais sustentável para indústria de produção animal, uma vez que seus compostos bioativos são biodegradáveis e podem auxiliar na redução da utilização de fármacos sintéticos e antibióticos. As macroalgas ainda podem ser cultivadas em sistemas

integrados, colaborando para reutilização de nutrientes e redução da descarga dos mesmos no ambiente (Fleurence et al., 2012; Thanigaivel et al., 2016).

Para camarões, diversos estudos relacionados com a utilização de macroalgas como ingredientes ou aditivos alimentares foram desenvolvidos. No entanto, os efeitos das algas no desempenho zootécnico desses animais se mostraram bastante variáveis, dependendo da espécie utilizada, métodos de processamento e, especialmente, dos níveis de inclusão ou substituição (Cruz-Soárez et al., 2008; Pallaoro et al., 2016; Rodríguez-González et al., 2014; Silva e Barbosa, 2009; Yu et al., 2016). No presente trabalho, a adição dos níveis 0,5, 2 e 4% da biomassa seca de ambas as algas na dieta não influenciou os parâmetros zootécnicos dos camarões (Tabela 2). Por outro lado, Niu et al. (2015) relataram que a adição de 1 a 3% da biomassa seca de *U. pinnatifida* melhorou o desempenho zootécnico do camarão *Penaeus monodon*, entretanto 5 e 6% de adição acarretou em decréscimos no crescimento dos animais. Neste sentido, cabe acrescentar que as macroalgas possuem uma ampla variação da sua composição bioquímica e nutricional, conforme sua localização geográfica ou época do ano (Boulom et al., 2014; Susanto et al., 2016; Thanigaivel et al., 2016), o que pode estar em parte associada às diferenças observadas no desempenho zootécnico dos animais quando alimentados com macroalgas.

Dentre os benefícios gerados pela adição das macroalgas na dieta, estão o incremento na absorção de nutrientes e a modificação da morfologia do trato digestivo dos animais. Yu et al. (2016) relataram que 2% de adição da biomassa seca da alga vermelha *Gracilaria lemaneiformis* aumentou o comprimento e melhorou a integridade dos microvilos das células do epitélio de absorção do camarão *L. vannamei*. Em juvenis de *P. monodon*, os níveis 1 e 2% da biomassa de *U. pinnatifida* provocou aumento no comprimento dos vilos intestinais (Niu et al., 2015). Similarmente, no presente trabalho foi observado que o nível de 0,5% de ambas as algas incrementou significativamente a superfície do epitélio de absorção do intestino dos camarões (Tabela 3; Fig. 1.).

Quanto às enzimas digestivas, estudos utilizando probióticos (Wang, 2007; Zokaefar et al., 2012), e outros aditivos alimentares como sais orgânicos (Silva et al., 2016) e extratos de plantas (Chithambaran e David, 2014) relataram o estímulo da atividade das enzimas digestivas de camarões. No presente trabalho, a adição de ambas as algas pardas não influenciou a atividade das enzimas proteolíticas avaliadas, no entanto todos os níveis de *S. filipendula* e os maiores de *U. pinnatifida*

aumentaram a atividade absoluta da amilase em relação ao grupo controle, enquanto a atividade específica dessa enzima aumentou apenas nos animais alimentados com *S. filipendula* (Tabela 4).

O aumento da atividade da amilase causado pelas algas pardas pode ser benéfico, pois as rações comerciais possuem elevada quantidade de ingredientes de origem vegetal, como farelo de soja, farinha de trigo e entre outros. A maior absorção dos carboidratos provenientes da degradação do amido desses ingredientes pode auxiliar na economia dos lipídeos e proteínas utilizados pelos camarões para geração de energia e gliconeogênese que, por sua vez, tornariam-se disponíveis para produção de biomassa e para outras funções fisiológicas (NRC, 2011). Embora no presente trabalho não tenha sido observado aumento significativo no crescimento dos animais, é importante destacar que as rações do experimento foram formuladas e produzidas utilizando farinha e óleo de peixe (fontes proteicas e lipídicas) de alta qualidade e em elevada proporção. Portanto, o fornecimento de ingredientes lipídicos e proteicos de qualidade pode ter atenuado o efeito do aumento da atividade da amilase, e consequente melhor aproveitamento dos carboidratos provenientes dos ingredientes de origem vegetal.

Em paralelo, o maior nível de *U. pinnatifida* aumentou a atividade absoluta e específica da lipase no hepatopâncreas dos camarões. Este incremento pode resultar em uma melhor absorção de lipídeos oriundos dos diferentes ingredientes da ração. Os lipídeos além de serem importantes para geração de energia, desempenham papéis fundamentais em diversos processos fisiológicos, tais como resposta imunológica (NRC, 2011; Zhang et al., 2013; Thanigaiavel et al., 2016).

As algas pardas apresentam alto teor de compostos bioativos, que estão associados com a melhora na resposta imunológica e das defesas antimicrobianas em diferentes animais, tais como terpenoides, compostos fenólicos, fucanas, e alguns ácidos graxos e esteróis (Milledge et al., 2016; Thanigaiavel et al., 2016). Em camarões, diversos estudos utilizando algas pardas e componentes extraídos destas algas observaram aumento da resposta imunológica e da resistência desses animais a infecções com *Vibrio* spp. e WSSV (Chen et al., 2016; Huynph et al., 2011; Immauel et al., 2012; Sivagnanavelmurugan et al., 2014). Similarmente, no presente trabalho a adição de 4% de *U. pinnatifida* causou menor mortalidade cumulativa após 72 h de infecção com WSSV em relação ao controle. Cabe destacar que em trabalho anterior a adição de 4% da biomassa seca de *U. pinnatifida* causou um aumento da atividade da enzima fenoloxidase do *L. vannamei* (Schleder

et al., 2017). Niu et al. (2015) também observaram aumento da atividade desta enzima do sistema imune do camarão *P. monodon* alimentado com dietas contendo de 1 a 6% da biomassa seca de *U. pinnatifida*.

Desta forma, o uso da biomassa seca de algas pardas como aditivo alimentar apresenta enorme potencial para carcinicultura, uma vez que constituem produtos sustentáveis e biodegradáveis, com alta viabilidade e baixo custo de produção, e que propiciam a melhora na fisiologia dos camarões, bem como o aumento da resistência à Doença da Mancha Branca, enfermidade que ainda impacta expressivamente a produção de camarões no Brasil e no mundo.

5. Conclusão

O presente trabalho demonstrou que algas pardas como aditivo alimentar melhoraram a fisiologia digestiva e a resistência dos camarões contra o WSSV, sem afetar o desempenho zootécnico. A adição de 4% da biomassa seca de *U. pinnatifida* na dieta reduziu a mortalidade dos camarões *L. vannamei* após o desafio com WSSV. Além disso, o menor nível (0,5%) de ambas as algas aumentou a superfície do epitélio de absorção de nutrientes no intestino dos camarões, e os diferentes níveis das algas provocaram aumento da atividade enzimática da amilase, enquanto a lipase foi estimulada apenas com a adição de 4% de *U. pinnatifida*.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESC (termo de outorga: 2015TR303), CAPES e CNPq. Somos gratos ao Gonzalo Soriano da Soriano SA. por fornecer gentilmente a biomassa seca de *Undaria pinnatifida*. Delano Dias Schleder recebeu bolsa da CAPES e licença para capacitação do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA). Agradecemos as bolsas de produtividade pagas pelo CNPq aos pesquisadores Felipe Vieira e Leila Hayashi.

Referências

- APHA, American Public Health Association, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA Inc., Baltimore.
- Borba, M., Nogueira, J., 2013. Carcinicultura Brasileira: o perfil do setor em cada unidade federativa produtora em 2011. Rev. ABCC. 2, 26-29.
- Boulom, S., Robertson, J., Hamid, N., Ma, Q., Lu, J., 2014. Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of

- seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. Food Chem. 161, 261-269.
- Carvalho-Filho, J., 2014. Camanor se reinventa e lucra mesmo com o vírus da mancha branca. Panorama da Aquicultura. 143, 45-51.
- Chakraborty, S., Ghosh, U., Balasubramanian, T., Das, P., 2014. Screening, isolation and optimization of anti-white spot syndrome virus drug derived from marine plants. Asian. Pac. J. Trop. Biomed. 4: S107-S117.
- Chen, Y.Y., Kitikiew, S., Yeh, S.T., Chen, J.C., 2016. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received fucoidan exhibit a defense against *Vibrio alginolyticus* and WSSV despite their recovery of immune parameters to background levels. Fish Shellfish Immun. 59, 414-426.
- Chithambaran, S., David, S., 2014. Antiviral property and growth promoting potential of Punarnava, *Boerhaavia diffusa*, in tiger prawn culture. Indian J. Geo-Mar. Sci. 43, 2236-2243.
- Costa, S.W., Vicente, L.R.M., Souza, T.M., Andreatta, E.A., Marques, M.R.F., 2010. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. Pesq. Agropec. Bras. 45, 1521-1530.
- Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G., Ricque-Merie, D., 2008. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture, in: Cruz-Suárez, L.E., Tapia-Salazar, M., Nieto-López, M.G. (Eds.), Avances en Nutrición Acuicola IX. UANL, Monterrey, pp. 304-333.
- FAO, 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to Food Security and Nutrition for all. Rome. (200 pp.).
- Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia. J. Invertebr. Pathol. 110, 166-173.
- Fleurence, J., Morancáis, M., Dumay, J., Decottignies, P., Turpin, V., Munier, M., Garcia-Bueno, N., Jaouen, P., 2012. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. Trends Food Sci. Tech. 27, 57-61.
- Huynh, T., Yeh, S.T., Lin, Y.C., Shyu, J.F., Chen, L.L., Chen, J.C., 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immun. 31, 286-293.
- Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan, M., Marudhupandi, T., Radhakrishnan, S., Palavesama, A., 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune

activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish Shellfish Immun. 32:551-564.

Kautsky, N., Rönnbäck, P., Tedengren, M., Troell, M., 2000. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. Aquaculture. 191, 145-161.

Lehmann, M., Schleder, D.D., Guertler, C., Perazzolo, L.M., Vinatea, L., 2016. Hypoxia increases susceptibility of Pacific white shrimp to white spot syndrome virus (WSSV). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 68, 397-403.

Milledge, J.J., Nielsen, B.V., Bailey, D., 2016. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. Rev Environ. Sci. Biotechnol. 15, 67-88.

Musthaq, S., Kwang, J., 2011. Oral vaccination of baculovirus-expressed vp28 displays enhanced protection against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. PloSOne. 6, 1-9.

Niu, J., Chen, X., Lu, X., Jiang, S.G., Lin, H.Z., Liu, Y.J., Huang, Z., Wang, J., Wang, Y., Tian, L.X., 2015. Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture. 435, 78-85.

NRC, National Research Council, 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp, National Academic Press, Washington.

Pádua, D., Rocha, E., Gargiulo, D., Ramosa, A.A., 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. Phytochem. Lett. 14, 91-98.

Pallaoro, M.F., Vieira, F.N., Hayashi, L., 2016. *Ulva lactuca* (Chlorophyta Ulvales) as co-feed for Pacific white shrimp. J. Appl. Phycol. 28, 3659-3665.

Rodríguez-González, H., Orduña-Rojas, J., Villalobos-Medina, J.P., García-Ulloa, M., Polanco-Torres, A., López-Álvarez, E.S., Montoya-Mejía, M., Hernández-Llamas, A., 2014. Partial inclusion of *Ulva lactuca* and *Gracilaria parvispora* meal in balanced diets for white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). J. Appl. Phycol. 26, 2453-2459.

Sanjeewa, K.K.A., Kim, E.A., Son, K.T., Jeona, Y.J., Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. J. Photoch. Photobio. B. 162, 100-105.

Schleder, D.D., Rosa, J.R., Guimarães, A.M., Ramlov, F., Maraschin, M., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Hayashi, L., Andreatta, E.R., 2017. Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on

- thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *J. Appl. Phycol.* <https://doi:10.1007/s10811-017-1129-z>. (2017)
- Silva, B.C., Jesus, G.F.A., Seiffert, W.Q., Vieira, F.N., Mourião, J.L.P., Jatobá, A., Nolasco-Soria, H., 2016. The effects of dietary supplementation with butyrate and polyhydroxybutyrate on the digestive capacity and intestinal morphology of Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Mar. Freshw. Behav. Phy.* 49, 447-458.
- Silva, R.L., Barbosa, J.M., 2009. Seaweed meal as a protein source for the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. Appl. Phycol.* 21, 193-197.
- Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B.J., Palavesam, A., Immanuel, G., 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish Shellfish Immun.* 39, 439-449.
- Strickland, J.D., Parsons, T.R., 1984. A practical handbook of seawater analysis (Bulletin 167), second ed. Unipub, Ottawa.
- Susanto, E., Fahmi, A.S., Abe, M., Hosokawa, M., Miyashita, K., 2016. Lipids, fatty acids, and fucoxanthin content from temperate and tropical brown seaweeds. *Aquat. Pr.* 7, 66-75.
- Thanigaivel, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., Thomas, J., 2016. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture.* 464, 529-536.
- Tomazelli Jr., O., Kuhn, F., Padilha, P.J.M., Vicente, L.R.M., Costa, S.W., Silva, B.C., Schleder, D.D., Boligon, A.A., Scapinello, J., Nesi, C.N., Dal Magro, J., Castellví, S.L., 2017. Effect of *Cynodon dactylon* extract on white spot virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Aquacult. Int.* 25, 1107-1122.
- Verbruggen, B., Bickley, L.K., van Aerle, R., Bateman, K. S., Stentiford, G.D., Santos, E.M., Tyler, C.R., 2016. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses.* 8, 1-29.
- Wang, Y.B., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* 269, 259-264.
- Yu, Y.Y., Chen, W.D., Liu, Y.J., Niu, J., Chen, M., Tian, L.X., 2016. Effect of different dietary levels of *Gracilaria lemaneiformis* dry powder on growth performance, hematological parameters and intestinal structure of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture.* 450, 356-362.
- Zhang, S.P., Li, J.F., Wu, X.C., Zhong, W.J., Xian, J.A., Liao, S.A., Miao, Y.T., Wang, A.L., 2013. Effects of different dietary lipid level on

the growth, survival and immune-relating genes expression in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immun. 34, 1131-1138.

Zokaeifar, H., Balcázar, J.L., Saad, C.R., Kamarudin, M.S., Sijam, K., Arshad, A., Nejat, N., 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immun. 33, 683-689.

Capítulo 5

Efeito combinado de duas espécies algas pardas sobre a resistência do camarão-branco-do-pacífico contra o choque térmico e a Mancha Branca

Resumo

Este trabalho analisou através de MALDI-TOF MS o perfil de lipídeos e proteínas em hemócitos de *Litopenaeus vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Undaria pinnatifida* (U) e *Sargassum filipendula* (S), respectivamente, com objetivo de avaliar o efeito combinado das mesmas sobre a resistência ao choque térmico e infecção com vírus da Mancha Branca (WSSV). Camarões ($11,0 \pm 0,2$ g) foram cultivados por diferentes períodos em tanques de 400 L (50 camarões por tanque) sob aeração constante e temperatura ($28,6 \pm 0,4$ °C), 100% de renovação de água diária e alimentação quatro vezes ao dia de acordo com o tratamento (dietas experimentais e controle sem adição da combinação de algas), tudo em quadruplicata. No 16° dia, 40 animais por tratamento foram submetidos ao choque térmico, sendo transferidos da água a $28,6 \pm 0,3$ °C para $11,5 \pm 0,1$ °C, mantidos por 1 h, e colocados novamente em água a $28,9 \pm 0,2$ °C. A mortalidade foi monitorada durante 24 h. No 22° dia, 55 animais por tratamento foram submetidos ao desafio com WSSV, e mantidos por 96 h para estimar a mortalidade. Foram coletados os hemócitos dos 10 camarões para análise de MALDI-TOF MS, antes e 15 min depois do choque térmico, e antes e 24 h após o desafio. O choque térmico causou elevada mortalidade de forma semelhante em todos os tratamentos, provocando expressivo impacto nos perfis de proteínas e lipídeos dos hemócitos, em grande parte relacionado a fluidez de membrana, metabolismo dos lipídeos e sistema imune. Já os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U tiveram significativamente menor mortalidade cumulativa (28,1 e 31,3%, respectivamente) que o controle (78.1%). Esta maior resistência ao desafio com WSSV foi causado provavelmente à modulação do metabolismo dos lipídeos e na síntese de peptídeos antimicrobianos nos hemócitos dos camarões. Em conclusão, foi observado um efeito combinado de ambas macroalgas sobre a resistência dos camarões ao choque térmico e ao desafio com WSSV.

Palavras-chave: *Undaria pinnatifida*; *Sargassum filipendula*;
Resistência ao choque térmico; Resistência ao WSSV; *Litopenaeus vannamei*

Abstract

This study aimed to evaluate lipid and protein profile of hemocytes from *Litopenaeus vannamei* fed combinations 0.5%:1%, 0.5%:2% and 0.5%:4% of *Undaria pinnatifida* (U) and *Sargassum filipendula* (S) by MALDI-TOF MS, in order to evaluate their synergistic effect on thermal shock and White Spot Syndrome Virus (WSSV) challenge resistance. Shrimp (11.0 ± 0.2 g) were reared under two set up, during 15 days for thermal shock trial and 21 days for viral challenge, all in 400 L tanks (50 shrimps/tank), under constant aeration and temperature (28.6 ± 0.4 °C), 100% of daily water exchange and feeding four times day⁻¹. At day 16, shrimp were submitted to thermal shock, passing from seawater at 28.6 ± 0.3 °C to seawater at 11.5 ± 0.1 °C for 1 h and then back to 28.9 ± 0.2 °C, and kept for 24 h to estimate the mortality. At day 22, shrimp were challenged with WSSV and kept for 96h to estimate the mortality. Hemocyte sampling for MALDI-TOF MS were performed before and 15 min after thermal shock, and before and 24h after infection. All treatments had similar mortality after thermal shock, which caused great impact on hemocyte lipid and protein profile, mostly related to membrane fluidity, lipid metabolism and immune system. Cumulative mortality of 0.5S/2U and 0.5S/4U treatments after infection were lower (28.1 and 31.3%, respectively) than control (78.1%). This higher resistance was probably associated to modulation of lipid metabolism and antimicrobial compounds. In conclusion, we observed a synergistic effect of both brown seaweeds on shrimp resistance to thermal shock and especially to WSSV infection.

Keywords: *Undaria pinnatifida*; *Sargassum filipendula*; Thermal shock resistance; WSSV infection resistance; *Litopenaeus vannamei*

Introdução

Algas pardas têm ganhado destaque devido aos seus compostos bioativos e seu potencial de aplicação em diversos setores da economia. Na Aquicultura há um crescente interesse em explorar as potencialidades dessas espécies. A incorporação destas algas nas dietas tem demonstrado resultados promissores para camarões (Cruz-Suárez et al. 2008; Cárdenas et al. 2015; Niu et al. 2015), abalone (Francis et al. 2008; Lee et al. 2016), e pepino-do-mar (Xia et al. 2012). Elas também têm sido empregadas com sucesso em sistemas multitróficos integrados, melhorando a ciclagem de nutrientes e reduzindo o impacto ambiental (Fleurence et al. 2012; Ratcliff et al. 2016). Além disso, muitos estudos demonstraram o efeito de suas propriedades bioativas na imunestimulação e resistência antimicrobiana em peixes e camarões (Huynh et al. 2011; Pádua et al. 2015; Yangthong et al. 2016)

As algas pardas e seus extratos têm demonstrado grande potencial no combate a doenças de camarões, por meio da melhora na resposta imune e da inibição da proliferação dos agentes patogênicos, tais como bactérias e vírus (Chotigeat et al. 2004; Immanuel et al. 2015; Niu et al. 2015). Este fato recebe maior relevância quando se considera a tendência atual de uso de produtos naturais em substituição aos antibióticos sintéticos. A utilização de algas e seus extratos segue uma abordagem sustentável e ambientalmente amigável, uma vez que são biodegradáveis e podem manter a qualidade de água dentro dos padrões de segurança sanitária e ambiental (Thanigaivel et al. 2016).

Adicionalmente, as algas pardas, particularmente as oriundas de ambientes frios, demonstraram a capacidade de promover a resistência contra o estresse térmico em animais aquáticos. Nesses animais, a mudança abrupta de temperatura pode contribuir para supressão da resposta imune (Thanigaivel et al. 2016). Algumas espécies de algas pardas, especialmente as de ambientes temperados, apresentam suas próprias estratégias para sobreviver à variação de temperatura, sendo submetidas a baixas temperaturas, e ainda a altas temperaturas quando expostas nos costões rochosos durante as marés baixas. Kandasamy et al. (2011, 2014) demonstraram que o nematoide *Caenorhabditis elegans* apresentou maior resistência ao estresse térmico e longevidade quando exposto a compostos extraídos da alga parda *Ascophyllum nodosum*.

No Brasil, a indústria de produção de camarões marinhos tem sofrido significativas perdas econômicas devido à Doença da Mancha Branca, especialmente na região Sul do país, onde 98,2% da produção de camarões foi dizimada entre 2004 e 2014. Além disso, a região sul do

Brasil enfrenta condições climáticas instáveis, com baixas temperaturas durante o inverno e ocorrência de variação abrupta de temperatura durante a primavera, com períodos de temperaturas elevadas (cerca de 28 °C), alternados com entradas de frentes frias acompanhadas por tempestades e quedas de temperaturas de quase 10 °C, em períodos curtos de tempo. O ciclo de produção de camarões no sul do Brasil começa a partir do final do inverno e início da primavera, portanto esses animais com frequência são submetidos a flutuações de temperatura estressantes, as quais podem afetar a produtividade e aumentar a suscetibilidade dos mesmo a surtos de enfermidades (Kautsky et al. 2000).

Em trabalhos anteriores, camarões alimentados com 4% da biomassa seca de *Undaria pinnatifida* apresentaram aumento da atividade da enzima fenoloxidase, ligada à resposta imune, redução da contagem de *Vibrio* spp. no intestino e menor mortalidade cumulativa (48%, enquanto o grupo controle apresentou 74%) ao desafio com o vírus da Mancha Branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*). Dietas contendo *Sargassum filipendula* não afetaram o status imunológico e a contagem bacteriana do intestino dos camarões. No entanto, os animais alimentados com 0,5 e 2% de *S. filipendula* apresentaram sobrevivência significativamente maior após o choque térmico (97%, enquanto o grupo controle apresentou 56%). Em oposição, os crescentes níveis de *U. pinnatifida* tiveram efeito negativo na resistência dos camarões ao choque térmico, com o nível 4% causando 100% de mortalidade (Schleder et al. 2017a,b).

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito combinado das algas pardas *U. pinnatifida* e *S. filipendula* sobre a resistência do camarão-branco-do-pacífico ao choque térmico e ao desafio com WSSV, e utilizar a análise de MALDI-TOF MS como uma tentativa para compreender os mecanismos responsáveis pela resistência dos animais.

Material e métodos

Animais experimentais

Foram utilizados camarões da espécie *Litopenaeus vannamei* provenientes da linhagem *high health* SPEEDLINE HB12, adquirida da empresa Aquatec Aquacultura Ltda. (Rio Grande do Norte, Brazil). Após a larvicultura, as pós-larvas (PLs) foram transferidas para tanques de 50 ton a uma densidade de estocagem de 1000 PLs m⁻³ (fase de berçário) e cultivadas em sistema de bioflocos. Quando os camarões

atingiram aproximadamente 2 g, estes foram realocados para novos tanques (50 ton) e cultivados até o tamanho de cerca de 11 g na densidade de estocagem de 200 camarões m⁻³ em sistema de bioflocos. Após a transferência para os tanques experimentais, os camarões foram aclimatados à nova condição por 8 h sem alimentação.

Biomassa seca das macroalgas

A macroalga *S. filipendula* foi coletada (autorização ICMBio n°: 47187-1) na praia do Sambaqui, Florianópolis SC/Brasil (27°29'35.0"S 48°31'39.6"W), durante o outono (Abril, 2015), e transportada para Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC). Primeiro, foi realizada a retirada manual de epífitas e qualquer material incrustado nas macroalgas, e em seguida foram lavadas rapidamente com água doce e secas a temperatura ambiente por 4 h. Posteriormente, foram colocadas em estufa e secas por 24 h a 35 °C, e então a 50 °C até estabilizar o peso. As macroalgas secas foram moídas, peneiradas (600 µm) e armazenadas em sacos plásticos escuros em sala refrigerada com desumidificador. A biomassa seca de *U. pinnatifida* foi gentilmente cedida pela empresa Soriano SA, Argentina. Os espécimes de *U. pinnatifida* foram coletados na Baía Bustamante, Chubut, Argentina, durante o verão (Janeiro, 2015), secas ao sol, moídas e peneiradas a 600 µm.

Dietas experimentais

As dietas foram formuladas utilizando o programa Optimal Fórmula 2000® versão 19102009, baseado nas recomendações e exigências nutricionais para o camarão-branco-do-pacífico (Gong et al. 2000; NRC 2011; Zhou et al. 2012). Os ingredientes secos foram previamente moídos e peneirados a 600 µm. Posteriormente, o microingredientes foram homogeneizados por 10 min e adicionados aos macroingredientes, os quais foram homogeneizados por 10 min utilizando um misturador de comida. Em seguida, foram adicionados os óleos, lecitina de soja e água (200 mL kg⁻¹ da dieta), e a mistura resultante foi peletizada utilizando peletizadora manual. Nas dietas experimentais, a biomassa seca das algas foi adicionada com diferentes combinações: 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *S. filipendula* (S) e *U. pinnatifida* (U) respectivamente, em substituição ao caulim. A dieta controle apresentou os mesmos ingredientes, porém sem adição das algas. A composição química foi analisada de acordo com o descrito por AOAC (1999) (Tabela 1).

Tabela 1 Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes (g kg ⁻¹)	Controle	0,5S/1U	0,5S/2U	0,5S/4U
Farinha de resíduo de salmão (640 g kg ⁻¹ PB)	220,0	220,0	220,0	220,0
Farelo de soja (450 g kg ⁻¹ PB)	370,0	370,0	370,0	370,0
Farinha de trigo	150,0	150,0	150,0	150,0
Óleo de fígado de bacalhau	35,0	35,0	35,0	35,0
Óleo de soja	10,0	10,0	10,0	10,0
Lecitina de soja	25,0	25,0	25,0	25,0
Premix vitamínico ^a	3,8	3,8	3,8	3,8
Premix mineral ^a	16,2	16,2	16,2	16,2
Fosfato monocálcico	25,0	25,0	25,0	25,0
Cloreto de sódio	11,5	11,5	11,5	11,5
Cloreto de potássio	10,0	10,0	10,0	10,0
Sulfato de magnésio	15,0	15,0	15,0	15,0
Vitamina C ^b	0,7	0,7	0,7	0,7
Carboximetilcelulose	25,0	25,0	25,0	25,0
Caulim	102,8	87,8	77,8	57,8
<i>S. filipendula</i> (biomassa seca)	0,0	5,0	5,0	5,0
<i>U. pinnatifida</i> (biomassa seca)	0,0	10,0	20,0	40,0
Composição centesimal (g kg ⁻¹)				
Umidade	112,9	112,3	110,2	109,65
Proteína bruta	330,5	329,9	328,8	329,6
Extrato etéreo	73,4	70,4	71,1	71,7
Cinzas	182,4	181,3	177,5	174,3
Energia bruta ^c	3.667	3.666	3.678	3.727

^a – In Vivo Nutrição e Saúde Animal Ltda. (São Paulo, SP, Brasil): vit. A - 900 mg kg⁻¹; vit. D₃ - 25 mg kg⁻¹; vit. E - 46.900 mg kg⁻¹; vit. K₃ - 1.400 mg kg⁻¹; cobalamina (B12) - 50 mg kg⁻¹; piridoxina (B6) - 33.000 mg kg⁻¹; riboflavina - 20.000 mg kg⁻¹; ácido nicotínico - 70.000 mg kg⁻¹; ácido pantotênico - 40.000 mg kg⁻¹; biotina - 750 mg kg⁻¹; ácido fólico - 3.000 mg kg⁻¹; cobre - 2.330 mg kg⁻¹; zinco - 10.000 mg kg⁻¹; manganês - 6.500 mg kg⁻¹; selênio - 125 mg kg⁻¹; iodo - 1.000 mg kg⁻¹; cobalto - 50 mg kg⁻¹; magnésio - 20 g kg⁻¹; potássio - 6,1 g kg⁻¹. ^b – L-ácido ascórbico-2-monofosfato 35%. DSM Produtos Nutricionais Brasil (São Paulo, SP, Brasil); ^c – cal g⁻¹. PB: proteína bruta.

Delineamento experimental

Foram utilizados tanques de polietileno de 400 L, contendo água salgada sob aeração e temperatura constante, povoados com 50 camarões (11,0 ± 0,2 g). Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia, e a quantidade diária de ração fornecida foi baseada no método de conversão programada. Vinte e cinco camarões por tanque foram

pesados semanalmente para monitorar o crescimento. O experimento seguiu o delineamento totalmente ao acaso, em quadruplicata.

Ao longo do experimento, foram feitas renovações diárias de 100% da água dos tanques, e monitorados os principais parâmetros de qualidade de água, tais como: oxigênio dissolvido e temperatura, avaliados duas vezes ao dia, e salinidade e pH, avaliados uma vez ao dia (multiparâmetro YSI, modelo Professional Plus). Amônia total foi analisada uma vez por semana de acordo com Strickland e Parsons (1984) e APHA (1995). Todos os parâmetros se mantiveram em níveis adequados para o cultivo de *L. vannamei*, oxigênio dissolvido $6,2 \pm 0,1$ mg L⁻¹, temperatura $28,6 \pm 0,4$ °C, salinidade $34,4 \pm 2,5$ mg L⁻¹, pH $7,9 \pm 0,3$, amônia total $0,9 \pm 0,9$ mg L⁻¹ N-NH₃.

No 16º dia, parte dos animais foi submetida ao choque térmico e a coleta de hemolinfa foi realizada antes e 15 min após ao choque térmico para análise de MALDI-TOF MS. Os animais restantes foram cultivados por mais seis dias, e no 22º dia foram submetidos ao desafio com WSSV. Também foi realizada coleta de hemolinfa para análise de MALDI-TOF MS, antes e após 24 h de infecção (Fig. 1).

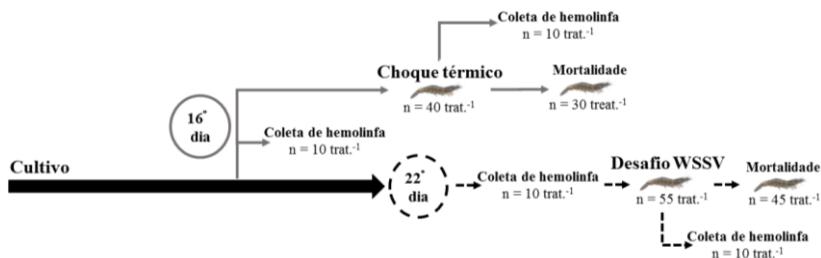


Fig. 1 Esquema do delineamento experimental, considerando choque térmico, desafio com WSSV e coletas para as análises de MALDI-TOF MS.

Choque térmico

Quarenta animais de cada tratamento foram transferidos simultaneamente dos tanques com água salgada a $28,6 \pm 0,3$ °C, para aquários de 60 L contendo água salgada a $11,5 \pm 0,1$ °C sob aeração constante (em duplicata), e mantidos nestas condições por 1 h. Após este período, eles foram transferidos simultaneamente de volta para tanques com água salgada a $28,9 \pm 0,2$ °C, e a sobrevivência foi monitorada por 24 horas após choque térmico (h.a.c.t.). A água salgada usada durante todo choque térmico foi proveniente do mesmo reservatório, apresentando a mesma salinidade $34,20$ mg L⁻¹.

Desafio com WSSV

No 22º dia, 55 camarões por tratamento foram transferidos para o Laboratório de Bioensaios do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA), e acondicionados em 12 tanques de 60 L (três por tratamento) contendo água salgada filtrada a 29 °C, salinidade 35 mg L⁻¹, sob aeração constante, para aclimação por 24 h. Após a aclimação, os camarões (12,9 ± 0,4 g) foram infectados oralmente via gavagem com aproximadamente 200 µL por animal (15,5 µL g⁻¹) de inóculo de WSSV com carga viral de 3,7 x 10⁸ µL⁻¹. No grupo controle WSSV-negativo foi fornecido um inóculo produzido a partir de camarões SPF livres de WSSV pela mesma via e na mesma proporção (15 µL g⁻¹). Durante 96 horas pós-infecção (h.p.i.) foi avaliada a mortalidade cumulativa dos camarões. Os animais foram alimentados uma vez ao dia com a respectiva dieta de cada tratamento.

Para produção do inóculo viral, primeiro o material infectante armazenado em nitrogênio líquido no Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA) foi reativado. Para isto, 50 µL do material infectante foi inoculado em animais SPF sadios (livres de WSSV, IMNV e IHNV). Aos primeiros sinais de doença, os animais foram sacrificados, triturados mecanicamente e homogeneizados em solução tampão (NaCl 330 mM, Tris 10 mM, pH 7,4) (1:10 p/v), e em seguida, centrifugados a 2.000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 9.000 x g por 10 minutos a 4 °C, filtrado (0,45 µm) e conservado em nitrogênio líquido (conforme Lehmann et al. 2016). A presença do vírus da mancha branca no inóculo experimental foi confirmada por PCR (kit Concepto Azul®).

Coleta e processamento das amostras e análise de MALDI-TOF MS

O processamento da hemolinfa foi feito como descrito por Kuhn-Nentwig et al. (2014) com pequenas modificações. Brevemente, amostras de hemolinfa de 200-250 µL foram coletadas individualmente de dez animais por tratamento usando solução tampão de amônia (0,45 M cloreto de amônia, 0,1 M glicose, 0,03 M citrato de amônia, 0,026 M ácido cítrico, 0,01 M EDTA, pH 4,6) contendo 0,010 M β-ciclodextrina (1:2 v/v) como anticoagulante. A hemolinfa foi então centrifugada a 1.000 x g por 15 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e os hemócitos foram ressuspensos em 100 µL de 0,1% TFA em água.

Posteriormente, os hemócitos foram congelados e descongelados 3 vezes em nitrogênio líquido para lisar as células (Bodzon-Kulakowska et al. 2007). Entre cada ciclo de congelamento e descongelamento, as

amostras foram agitadas utilizando vortex para otimizar a lise celular. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado a $20.800 \times g$ por 20 min a 4°C e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Para análise, foram pipetados $0,5 \mu\text{L}$ das amostras de sobrenadante do lisado celular e misturadas sobre uma placa para MALDI-TOF de aço escovado (Bruker Daltonics, Germany) com $0,5 \mu\text{L}$ da matriz 2,5-ácido dihidroxi-benzoico (20 mg mL^{-1}), diluída em 70:30 Acetonitrila:H₂O/0,2% TFA, para análise de lipídeos, ou da matriz ácido sinapínico (38 mg mL^{-1}), para análise de proteínas. As amostras foram depositadas em triplicata e deixadas secar a temperatura ambiente.

Os espectros de massas foram adquiridos utilizando o Autoflex III MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipado com 200 Hz laser SmartBeam, e usando a função AutoXecute do FlexControl 3.3 acquisition software. Para análise de lipídeos, os espectros foram adquiridos no modo refletor positivo com intervalo de massa de m/z 500–1.000. Para análise de proteínas, os espectros foram adquiridos no modo linear positivo com intervalo de massa de m/z 2.000–20.000. Para cada amostra, 4.000 disparos de laser foram acumulados em 20 posições diferentes, escolhidas pelo modo de varredura aleatória. Os espectros de massas das proteínas e lipídeos gerados foram externamente calibrados e tiveram a linha basal subtraída usando Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics). Para visualizar e comparar os espectros, bem como identificar os picos diferencialmente modulados, foi gerado espectros médios usando ClinProTools 3.0 software (Bruker Daltonics).

Parâmetros diferentes de processamento do ClinProTools foram usados para análise dos perfis de proteínas e lipídeos, com base em Kang et al. (2011) e Munteanu et al. (2012). Para análise do perfil de lipídeos, os seguintes parâmetros foram usados: 500 de resolução; subtração da linha de base “top hat” com linha de base mínima de 20% de largura, e foi permitido a exclusão de espectros nulos. Para a recalibração dos espectros, foi permitida uma tolerância máxima de massa de 2.000 ppm e correspondência em 20% dos picos. Espectros não recalibrados foram excluídos. A seleção de picos foi realizada sobre o espectro médio utilizando $S/N > 5$, e para o cálculo de pico usou-se as intensidades e o tipo de integração nível zero. Para a análise do perfil de proteínas os seguintes parâmetros foram usados: 800 de resolução; subtração da linha de base “top hat” com linha de base mínima de 10% de largura, e algoritmos de Savitsky–Golay para suavização (5 ciclos com m/z de 6 Da). Foi permitida a exclusão de espectros nulos e ruídos de espectro com limiar de ruído de 1,00. Para a recalibração dos espectros, foi permitida uma tolerância máxima de massa de 1.000 ppm

e correspondência em 30% dos picos. Espectros não recalibrados foram excluídos. A seleção de picos foi realizada sobre o espectro médio utilizando $S/N > 5$, e para o cálculo do pico usou-se as intensidades e o tipo de integração nível zero.

Para identificação dos lipídeos, primeiro foi feita análise de MALDI-TOF MS/MS (LIFT) dos picos de interesse, e a partir dos dados do MALDI-TOF MS/MS juntamente com as informações da base de dados lipidmaps (<http://www.lipidmaps.org>) foram feitas as confirmações das espécies de lipídeos. Para proteínas as massas de interesse foram apenas comparadas com a massas de proteínas da base de dados UniprotKB (<http://www.uniprot.org>), descritas para camarões.

Análise dos dados

Os dados de mortalidade após o choque térmico e o desafio com WSSV foram analisados pelo teste de Kaplan-Meier. Os dados de MALDI-TOF MS foram avaliados pelos testes Teste T/ANOVA (TTA) ou Wilcoxon/Kruskal-Wallis (WKW) de acordo com sua distribuição normal ou não-normal, avaliada pelo teste de Anderson-Darling (PAD), com a finalidade de verificar diferenças em cada pico de massa. Dados com distribuição normal (valor de $p \text{ PAD} > 0,05$) foram submetidos a análise usando TTA e dados com distribuição não-normal (valor de $p \text{ PAD} \leq 0,05$) foram submetidos a análise usando WKW test. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Para identificar diferenças no perfil de proteínas e lipídeos entre os diferentes tratamentos foi utilizado a análise dos componentes principais (PCA) usando o software CPT.

Resultados

Choque térmico

Não houve diferença na mortalidade cumulativa após o choque térmico dos camarões alimentados com as diferentes combinações das algas em relação ao controle (Fig. 2). Similarmente, a análise de MALDI-TOF MS não revelou diferença nos perfis de lipídeos dos hemócitos entre os tratamentos, antes e após o choque térmico. De fato, a diferença encontrada nos perfis lipídicos foi apenas na comparação antes e depois do choque dentro de cada tratamento, afetando 49 lipídeos. De forma geral, nos quatro tratamentos os lipídeos dentro da faixa m/z 500 a 700 reduziram após o choque térmico, exceto pelas massas 560,46 e 574,11, e os lipídeos com massas maiores que m/z 700 aumentaram após o choque, exceto pela massa 768,75. MALDI-TOF MS/MS identificou alguns lipídeos abaixo de m/z 700 como hexosil-

esfingosina sulfatada (SHexSph), acil-carnitina (CAR), lisofosfatidilcolina (LPC) e fosfatidilcolina (PC), enquanto que acima de m/z 700 foram identificados apenas LPC e PC (Tabela 2).

Os perfis de proteínas apresentaram padrões parecidos aos dos lipídeos, com apenas algumas diferenças entre os tratamentos antes do choque térmico (6 proteínas). Novamente, foi o choque térmico que causou diferenças no perfil dos hemócitos em todos os tratamentos, afetando 56 proteínas. Pequenas proteínas ou peptídeos com massa variando de m/z 2.000 a 2.400 apresentaram aumento na intensidade do sinal após o choque térmico, enquanto proteínas com massas maiores que m/z 2.400 reduziram intensidade do sinal, exceto 2.921,60 e 4.152,69. A m/z 3.503,21 mostrou um comportamento diferente entre os tratamentos: aumentou o sinal no grupo controle e reduziu nos demais tratamentos (Tabela 3).

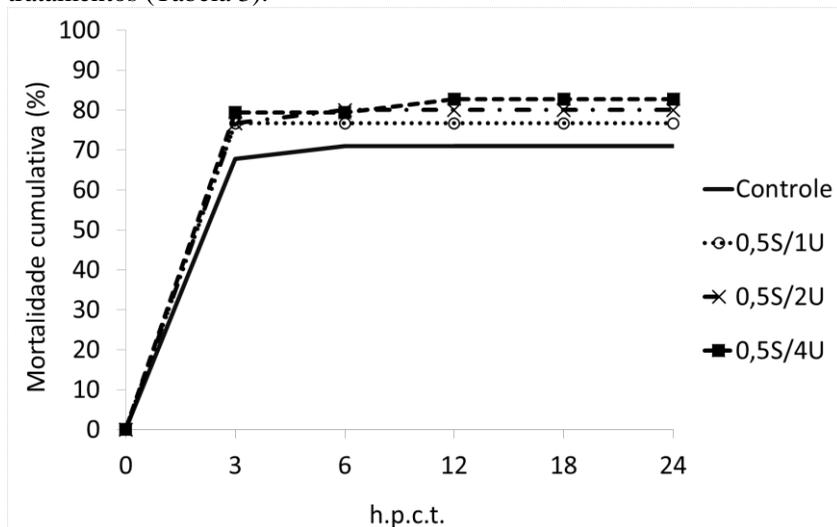


Fig. 2 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* (S) e *Undaria pinnatifida* (U) respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, 24 horas pós choque térmico (h.p.c.t.). Não houve diferença significativa ($p > 0,09$) entre todos os tratamentos.

Desafio com WSSV

Os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U tiveram menor mortalidade cumulativa após 96 h de infecção com WSSV ($p < 0,05$), enquanto que o tratamento 0,5S:1U apresentou mortalidade semelhante ao grupo controle (Fig. 3). A análise de MALDI-TOF MS mostrou que após 21

dias de alimentação, os perfis de lipídeos e proteínas dos hemócitos demonstraram apenas leves mudanças entre os grupos. Por outro lado, em 24 horas pós-infecção (h.p.i.) foi identificada elevada diferenciação entre os tratamentos. Nesse período, os lipídios dentro da faixa de m/z 500 a 700 aumentaram a intensidade do sinal. Esses lipídeos, foram identificados em grande parte como SHexSph, CAR, LPC, lisofosfatidilserina (LPS) e PC. Por outro lado, os lipídeos acima de m/z 700 apresentaram redução da intensidade do sinal, os quais foram identificados em sua maioria como PC e LPC (Tabela 4).

Considerando o perfil de proteínas, os peptídeos ou pequenas proteínas com massa variando de m/z 2.000 a 2.500 apresentaram redução na intensidade do sinal após infecção com WSSV, apenas nos tratamentos com algas pardas, e principalmente nos dois com maior sobrevivência (0,5S:2U e 0,5S:4U). De forma geral, proteínas com massa maior que m/z 2.500 aumentaram a intensidade do sinal após infecção, no entanto houve uma considerável quantidade dessas proteínas que apresentaram redução de sinal (Tabela 5). Cabe ressaltar que as proteínas dentro da faixa de 4.000 a 5.000 aumentaram o sinal somente nos tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U, e os picos m/z 5.728 e 6.104 reduziram apenas nesses tratamentos. Adicionalmente, a proteína 5.258 reduziu o sinal no grupo controle, enquanto nos tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U aumentou.

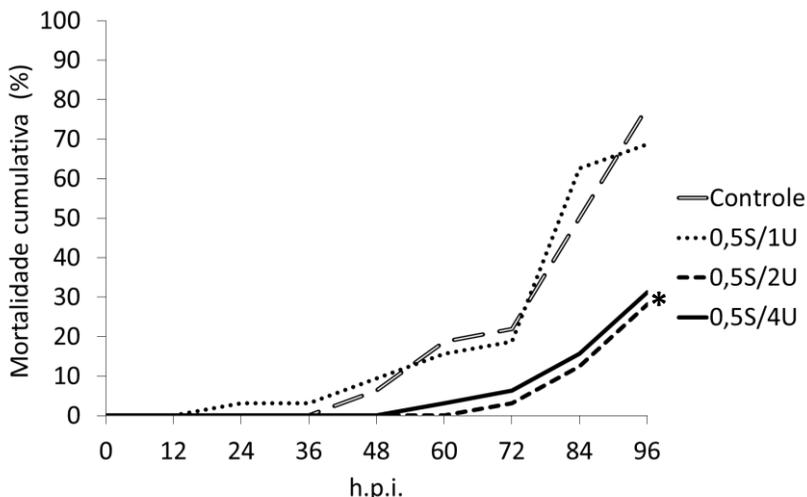


Fig. 3 Mortalidade cumulativa de *Litopenaeus vannamei* alimentados com dietas contendo 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* (S) e *Undaria pinnatifida* (U) respectivamente, e a dieta controle sem suplementação.

em 96 horas pós-infecção (h.p.i.) com WSSV. Houve diferença significativa (*) na mortalidade dos tratamentos 0,5S:2U ($p=0,0001$) e 0,5S:4U ($p=0,0006$) em relação ao grupo controle. Não houve diferença ($p>0,09$) entre o tratamento 0,5S:1U e o grupo controle.

Discussão

Em geral, todos tratamentos apresentaram alta mortalidade após o choque térmico (Fig. 2). Em trabalho anterior, *S. filipendula* (0,5% e 2%) diminuiu expressivamente a mortalidade após choque térmico, enquanto níveis crescentes de *U. pinnatifida* tiveram efeito negativo na resistência ao choque térmico (Schleder et al. 2017a). Infelizmente, no presente trabalho 0,5% de *S. filipendula* apenas evitou o efeito negativo da *U. pinnatifida*, porém não foi suficiente para superá-lo. Desta forma, futuros estudos devem ser realizados para avaliar se níveis maiores de *S. filipendula*, em combinação com *U. pinnatifida*, poderiam aumentar a resistência dos camarões ao choque térmico.

Dentre os lipídeos, as principais classes identificadas através de MALDI-TOF MS/MS foram SHexSph (sulfatídeo), CAR, LPC e PC. Os sulfatídeos são glicolipídeos multifuncionais envolvidos em funções ligadas ao sistema nervoso, glicemia, sistema imune e infecção bacteriana e viral (Takahashi e Suzuki, 2012). Grande parte dos trabalhos com esse grupo de lipídeos são em humanos ou mamíferos, portanto pouco se sabe sobre seu papel em invertebrados. Por outro lado, as L-carnitinas têm sido associadas à redução do impacto do estresse oxidativo e térmico em peixes e crustáceos. Estas são necessárias para transferência de ácidos graxos de cadeia média ou longa do citosol para mitocôndria para produção de energia, e demonstram atividade antioxidante potente, reduzindo a peroxidação de lipídeos (Harpaz 1999, 2005). Já os LPCs compreendem lipídeos com múltiplas funções, tais como formação de fosfolipídeos das membranas celulares, sinalização celular, inibição da agregação plaquetária, atração de monócitos por células apoptóticas (sinalização “find me”) e indução de apoptose (Makide et al. 2009; Poon et al. 2014; Yamashita et al. 2014; Li et al. 2016). Os LPCs são os lisofosfolipídeos mais abundantes no plasma, enquanto sua concentração no interior das células deve ser estritamente controlada, devido a sua atividade citolítica (Yamashita et al. 2014). Neste sentido, Kakisaka et al. (2012) demonstraram que os LPCs em hepatócitos de camundongo causaram disfunção mitocondrial e, conseqüentemente, induziram apoptose. E Lee et al. (2016) identificaram o incremento de espécies de lisofosfolipídeos, incluindo LPC, juntamente com a redução dos PCs em células com leucemia

induzida por ACD, e sugeriram que a modulação desses tipos de lipídeos tem um importante papel na apoptose

Conforme sugerido por Schleder et al. (2016) e Schleder et al. (2017a), a mortalidade observada após choque térmico pode ser consequência de danos estruturais a proteínas e outras biomoléculas, mudanças estruturais e funcionais das membranas celulares, e/ou associada à condição de hipóxia e re-oxigenação imposta aos animais durante o processo de choque térmico. Esta condição geralmente leva ao estresse oxidativo, resultando em peroxidação dos lipídeos e disfunção celular (Hermes-Lima et al. 2015). Desta forma, os dados do presente trabalho sugerem que mortalidade após o choque térmico pode estar relacionada com o aumento da suscetibilidade dos camarões ao estresse oxidativo devido à redução das acil-carnitinas, e ainda com a indução de apoptose e alteração dos processos de sinalização celular e formação de fosfolipídeos da membrana, causados pela modulação diferencial dos LPCs com massa inferior e superior a m/z 700.

Por outro lado, o incremento dos PCs com ácidos graxos insaturados em todos os tratamentos pode constituir uma resposta dos camarões ao choque térmico, de modo a aumentar a fluidez da membrana. Os PCs estão entre os principais fosfolipídeos constituintes das membranas celulares, e a incorporação de ácidos graxos de cadeia longa nos fosfolipídeos é um mecanismo comum utilizado para incrementar a fluidez da membrana (adaptação da homeoviscosidade) quando em exposição ao frio (Pruitt 1990; Hayward et al. 2014). De fato, a capacidade de ajustar a fluidez da membrana tem sido descrita em diversos organismos que apresentam resistência ao frio, tais como crustáceos, insetos, plantas e microrganismos (Pruitt 1990; Los e Murata 2004; Lee Jr. et al. 2006; Malone et al. 2015; Córcoles-Sáez et al. 2016). No entanto, o aumento na intensidade de sinal de PCs com ácidos graxos insaturados em todos os tratamentos no presente trabalho não foi suficiente para sobrepujar o impacto do choque térmico.

Neste contexto, Schleder et al. (2016) relataram que os camarões alimentados com 0,5% de *S. filipendula* apresentaram um aumento expressivo no sinal do PCs com ácidos graxos insaturados após o choque térmico, sendo 4 vezes maior em relação ao controle. Além disso, o PC 33:1 (m/z 768,75) foi o que apresentou maior incremento de sinal após choque térmico no tratamento com 0,5% de *S. filipendula*, sendo 4 vezes maior em relação ao controle, enquanto no presente trabalho foi observado o comportamento oposto. Dessa forma, ficou evidente que a adição de *U. pinnatifida* na dieta reduziu os efeitos benéficos de *S. filipendula* nos camarões frente ao choque térmico.

Tabela 2 Dados de MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após o choque térmico.

m/z	Lipid Assignment		Control	0.5S:1U	0.5S:2U	0.5S:4U
508.17	SHexSph (d14:1)	M+Na ⁺	↓	↓	↓	↓
509.48	-	-	-	↓	↓	↓
511.11	-	-	↓	↓	×	↓
518.48	CAR (22:2)	M+K ⁺	↓	↓	↓	↓
520.50	-	-	↓	↓	↓	↓
542.46	LPC (18:2)	M+Na ⁺	↓	↓	↓	↓
560.46	CAR (28:4)	M+H ⁺	↑	↑	↑	↑
564.49	LPC (20:5)	M+Na ⁺	×	↓	↓	↓
566.56	CAR (28:1)	M+H ⁺	↓	↓	↓	↓
574.11	CAR (26:2)	M+K ⁺	↑	↑	↑	↑
580.55	-	-	↓	↓	×	↓
588.54	LPC (28:1)/CAR (28:1)	M+H ⁺ / M+Na ⁺	↓	↓	↓	↓
594.65	CAR (30:1)	M+H ⁺	↓	↓	↓	↓
604.47	CAR (29:0)	M+Na ⁺	↓	×	×	×
605.06	-	-	×	↓	×	×
606.49	CAR (30:6)	M+Na ⁺	↓	×	×	×
616.56	LPC (23:0)/ PC (22:0)	M+Na ⁺ / M+Na ⁺	↓	↓	↓	↓
622.63	-	-	↓	↓	×	↓
633.17	-	-	↓	×	×	↓
650.68	LPC (26:4)	M+Na ⁺	↓	↓	×	↓
672.65	PC (26:0)	M+Na ⁺	↓	×	×	↓
676.68	-	-	↓	×	×	↓
732.78	LPC (32:5)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
734.70	LPC (32:4)	M+Na ⁺	↑	×	↑	↑
754.78	PC (32:1)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
756.78	PC (32:0)/LPC (33:0)	M+Na ⁺ / M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
758.83	LPC (34:6)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
760.82	PC (33:5)/LPC (34:5)	M+Na ⁺ / M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
768.75	PC (33:1)	M+Na ⁺	↓	↓	↓	↓
778.80	PC (34:3)	M+Na	↑	↑	↑	↑
780.87	PC (34:2)	M+Na	↑	↑	↑	↑

781.89	-	-	↑	↑	↑	×
782.84	PC (34:1)	M+Na ⁺	×	↑	↑	↑
786.86	PC (35:6)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
788.82	PC (35:5)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
794.82	PC (37:5)	M+Na ⁺	×	↑	↑	↑
802.84	PC (36:5)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
804.83	PC (36:4)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
806.89	PC (36:3)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
808.89	PC (36:2)	M+Na ⁺	×	↑	↑	↑
810.81	PC (36:1)	M+Na ⁺	×	↑	↑	↑
828.88	PC (38:6)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
829.83	-	-	↑	×	↑	↑
830.85	PC (38:6)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
834.88	PC (38:3)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑
836.83	PC (38:2)	M+Na ⁺	×	×	×	↑
854.88	PC (40:7)	M+Na ⁺	×	↑	↑	↑
856.81	PC (40:6)	M+Na ⁺	↑	↑	↑	↑

↑ = aumentou após o choque térmico; ↓ = diminuiu após o choque térmico; × = não afetou

Adicionalmente, o estresse térmico afeta a regulação de proteínas envolvidas em vários processos biológicos, como metabolismo de biomoléculas, produção de energia, transdução de sinal, defesa contra estresse oxidativo, processamento e degradação de proteínas (Fan et al. 2013; Tomanek 2014; Richard et al. 2016). No presente trabalho, embora não tenha sido realizado o processamento das proteínas para identificação, foi feita a associação com proteínas com massas similares já identificadas em diferentes espécies de camarão, e presentes no banco de dados UniprotKB e na literatura.

Proteínas dentro da faixa m/z 2.000 e 2.400 apresentaram aumento do sinal após o choque térmico em todos os tratamentos, enquanto proteínas maiores que m/z 2.400 de forma geral apresentaram redução do sinal. Schleder et al. (2016) relataram que os camarões de ambos os tratamentos (controle e alimentados com 0,5% de *S. filipendula*) também demonstraram redução do sinal de proteínas com massa entre m/z 3.000 e 5.000. Conforme a base de dados UniprotKB, nessa faixa de massa pode-se encontrar subunidades de citocromo c oxidase e de ATPase de diferentes espécies de camarões,. Essas proteínas são ligadas à produção de energia por via aeróbica, e sua redução pode estar associada à mudança do metabolismo energético com objetivo de priorizar as vias anaeróbicas, comumente observado em animais submetidos ao frio, e/ou pode estar relacionada aos efeitos da condição de hipóxia e re-oxigenação em que os animais são submetidos

durante o choque térmico, sendo uma das causas do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e consequente estresse oxidativo (Li e Jackson 2002; Hayward et al. 2014).

Por outro lado, Schleder et al. (2016) identificaram aumento no sinal das proteínas dentro da faixa m/z 5.300 e 11.000 após choque térmico, especialmente nos animais alimentados com 0,5% de *S. filipendula*. Nessa faixa de massa, predomina-se nos hemócitos são os peptídeos antimicrobianos, tais como penaeidinas, crustinas e fatores antilipopolisacarídeo (ALFs), as quais são consideradas as principais famílias de peptídeos antimicrobianos de camarões. Estes peptídeos antimicrobianos apresentam potente atividade contra uma ampla gama de patógenos, variando de bactérias (Gram + e -), fungos e vírus (Cuthbertson et al. 2008; Smith et al. 2008; Rosa et al. 2013).

Dessa forma, os dados do perfil de lipídeos e proteínas do presente trabalho indicam que o choque térmico causou profundas mudanças na fisiologia celular, impactando a defesa antimicrobiana, metabolismo energético, defesa antioxidante, regulação da morte celular (apoptose) que, juntamente com um aumento insuficiente da fluidez da membrana, podem explicar, pelo menos em parte, a suscetibilidade dos camarões de todos os tratamentos frente ao choque térmico. Analogamente, Fan et al. (2013) observaram que em hemócitos de *L. vannamei* exposto ao estresse por frio houve aumento de proteínas efectoras de apoptose e redução da abundância de hemocianinas e das defesas antioxidantes, levando a uma disfunção na resposta imune dos animais. Entretanto, futuros estudos devem ser realizados utilizando abordagens de proteômica juntamente com MALDI-TOF MS com objetivo de identificar especificamente as proteínas alteradas pelo choque térmico, e elucidar as mudanças observadas.

Tabela 3 Dados de MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após o choque térmico.

Mass (Da)	Protein assignment*	Control	0.5S:1U	0.5S:2U	0.5S:4U
2010.49	-	×	↑	↑	↑
2033.91	-	×	↑	↑	↑
2056.96	-	↑	↑	↑	↑
2078.73	-	×	↑	↑	↑
2259.36	Glutathione transferase isozyme II (2254 Da)/ATPase subunit 8 (2246 Da)	×	↑	↑	×
2281.69	-	↑	↑	↑	↑
2302.44	-	↑	↑	↑	↑
2323.67	-	↑	↑	↑	↑
2348.68	-	↑	↑	↑	↑
2372.54	NADH dehydrogenase subunit I (2376 Da)	↑	↑	↑	↑
2405.74	-	×	↓	×	↓
2432.41	-	×	↓	↓	↓
2472.10	-	↓	×	↓	↓
2538.19	-	↓	↓	↓	↓
2921.60	-	↑	×	×	×
2980.07	-	↓	↓	↓	↓
3178.50	Translation elongation factor eEF-1 alpha chain (3178 Da)	×	↓	↓	↓
3301.11	-	↓	↓	↓	↓
3350.46	-	×	↓	×	×
3479.07	-	↓	↓	↓	↓
3503.21	-	↑	↓	↓	↓
3645.26	ATPase subunit 8 (3646 Da)	↓	↓	↓	↓
3659.75	-	↓	↓	↓	↓
3684.36	-	↓	↓	↓	↓
3753.46	ATPase subunit 8 (3768 Da)	↓	↓	↓	↓
4152.69	-	×	↑	↑	↑
4416.83	Cytochrome oxidase subunit I (4421 Da)	↓	↓	↓	↓
5223.31	Cytochrome b (45 AA) (5225 Da)	×	×	×	↓
5255.13	Cytochrome oxidase subunit I (5258 Da)	↓	×	↓	↓
5269.38	-	↓	↓	↓	↓
5373.73	Cytochrome oxidase	×	↓	×	↓

	subunit 1 (5374 Da)				
5421.92	Cytochrome c oxidase subunit 1 (5.416 Da)	↓	↓	↓	↓
5474.39	-	↓	↓	↓	↓
5582.49	Penaeidin-1 (5.484,8 Da)	↓	↓	↓	↓
5722.68	Superoxide dismutase (5743 Da)	↓	↓	↓	↓
6100.15	Artemia mitochondrial ATPase 6 gene (6092 Da)/ATP synthase protein 8 (6116 Da)	↓	×	↓	×
6240.58	ATP synthase F0 subunit 8 (6.238 Da)	×	↓	↓	↓
6352.35	-	↓	↓	↓	↓
6600.65	Penaeidin-3a (6617.4 Da)	×	×	↓	×
6810.88	Phospholipase C-like protein (6802 Da)	↓	↓	↓	↓
7384.28	Antimicrobial peptide PEN4-1 (7372 Da)	×	×	↓	×
7416.18	Penaeidin-4c (7423 Da)	×	×	↓	×
7876.02	PEN2-1 (7833 Da)	×	×	↓	↓
8038.31	Sarcoplasmic calcium-binding protein 1 (8041 Da)	↓	×	↓	↓
8242.61	Cytochrome c oxidase subunit 1 (8248 Da)	×	×	×	↓
8267.15	-	↓	×	×	↓
8348.09	Chitinase (8341 Da)/Penaeidin-3l (8351 Da)	×	×	×	↓
8553.10	-	×	↓	↓	↓
8964.98	Small heat shock protein (8966 Da)	×	×	↓	↓
9028.38	Phosphotransferase (9035 Da)	↓	↓	↓	↓
9748.13	-	↓	×	×	↓
10882.47	Rab11 (10889 Da)	×	×	↓	×
12548.40	Histone H3 (12559,12566 Da)/Antimicrobial peptide type 1 Ic (12564 Da)	↓	↓	↓	↓
13449.14	Enolase (13448 Da)/NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 3 (13444 Da)	×	↓	↓	×
13457.88	Enolase (13452, 13462 Da)	↓	×	×	↓
14197.51	Cytochrome b (14191 Da)/Cytochrome c oxidase subunit 1 (14204 Da)	↓	×	↓	↓

↑ = aumentou após o choque térmico; ↓ = diminuiu após o choque térmico; × = não afetou. *Proteínas com massa similar na base de dados UniProtKB para espécies de camarão

Em relação ao desafio com WSSV, a combinação de *S. filipendula* e *U. pinnatifida* causou o aumento da resistência dos camarões ao WSSV, uma vez que os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U apresentaram maior sobrevivência após o desafio em comparação ao grupo controle (Fig. 3), e até mesmo comparado com camarões alimentados com as mesmas algas separadamente (Schleder et al. 2017b). Após 24 h.p.i. camarões de todos os tratamentos mostraram aumento geral nos lipídios menores que m/z 700, entretanto nessa faixa de massa os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U apresentaram aumento significativo no sinal de lipídeos específicos. Além disso, os camarões alimentados exclusivamente com as diferentes combinações das algas mostraram redução do sinal de lipídeos maiores que m/z 700 (Tabela 4). O padrão do perfil de lipídeos demonstrado pelos camarões alimentados com as algas após o desafio com WSSV foi o oposto do demonstrado após o choque térmico.

Hsieh et al. (2015) relataram que o WSSV induz a lipogênese durante o estágio tardio de infecção (24 h p.i.), com intuito de suprir a demanda de lipídios necessários para replicação e montagem dos virions. Analogamente, vírus herpes simplex 1 também estimula a síntese de fosfolipídeos, a fim de manter a quantidade suficiente de constituintes de membrana para o envolvimento dos capsídeos por brotamento da membrana nuclear e do complexo de Golgi, e fornecer membrana para formação dos vacúolos de transporte (Sutter et al. 2012). Portanto, a redução nos sinais dos PCs após 24 h.p.i., majoritariamente nos tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U, pode estar relacionado com a diminuição do suprimento de lipídeos requerido para montagem dos virions de WSSV, causando prejuízos na capacidade de infecção deste vírus.

Dentre os lipídeos que aumentaram de sinal após 24 h.p.i. (< m/z 700) pode-se destacar o SHexSph (sulfatídeo) e os lisofosfolipídeos. O sulfatídeo m/z 508,18 incrementou apenas nos animais alimentados com as combinações de algas, mais intensamente nos tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U. Esse lipídeo apresenta diversas funções em humanos e mamíferos, dentre elas no sistema imune (Takahashi e Suzuki, 2012; Jeon et al. 2017), entretanto o papel dele em camarões e na infecção com WSSV ainda precisa ser elucidado. Adicionalmente, a maioria dos lisofosfolipídeos aumentaram nos tratamentos com adição das algas.

Essa classe de lipídeos está ligada com diferentes funções, dentre elas a promoção da morte celular (apoptose). Durante o processo de replicação, há diversas evidências que o WSSV primeiramente inibe a apoptose para manter um ambiente apropriado para replicação, e em fase tardia induz a apoptose para facilitar a saída da célula e dispersão dos vírions (Verbruggen et al. 2016). Yuan et al. (2016) demonstraram que o WSSV induz apoptose nos hemócitos de *L. vannamei* apenas após 48 h de infecção; e através da inativação de um inibidor específico de apoptose, utilizando RNA de interferência, causaram a indução precoce de apoptose após infecção com WSSV, aumentando a sobrevivência dos animais. Por conseguinte, a indução de apoptose durante as primeiras 24 h de infecção pode constituir um mecanismo importante na resistência dos camarões dos tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U contra WSSV.

Tabela 4 Dados de MALDI-TOF MS referentes aos lipídeos diferencialmente modulados ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após 24 h de infecção com WSSV.

m/z	Lipid Assignment		Control	0.5S:1U	0.5S:2U	0.5S:4U
508.18	SHexSph (d14:1)	M+Na ⁺	×	↑	↑↑	↑↑
511.11	-	-	↑	↑↑	↑↑	×
512.21	-	-	↑	↑	×	×
518.47	CAR (22:2)	M+K ⁺	×	↓	×	×
522.79	LPC (18:1)/ LPS (18:2)	M+H ⁺ / M+H ⁺	×	↑	↑	↑↑
530.18	-	-	×	×	↑	↑
533.18	-	-	↑	↑↑	↑↑	×
545.15	-	-	↑	×	×	×
549.17	-	-	×	×	↑	×
564.50	LPC (20:5)	M+Na ⁺	×	×	↑	×
567.17	-	-	↑	↑	↑	×
572.21	CAR (26:3)/ LPC (20:1)	M+K ⁺ / M+Na ⁺	×	↑	×	×
574.15	CAR (26:3)	M+Na ⁺	×	×	×	↓
586.27	-	-	↑	×	↑	×
589.21	-	-	×	↑	×	×
616.90	LPC (23:0)/PC (22:0)	M+Na ⁺ / /M+Na ⁺	×	×	×	↑
624.67	-	-	×	×	↑	×
633.17	-	-	×	×	×	↓
659.57	-	-	×	×	×	↑
700.73	PC (28:0)	M+Na ⁺	×	×	↑	×
732.81	LPC (32:5)	M+Na ⁺	×	↓	×	↓
754.82	PC (32:1)	M+ Na ⁺	×	×	↓	↓
756.82	PC (32:0)/ LPC (33:0)	M+Na ⁺ / M+ Na ⁺	×	×	×	↓
758.84	LPC (34:6)	M+ Na ⁺	×	↓	↓	×
760.83	PC (33:5)/ LPC (34:5)	M+Na ⁺ / M+ Na ⁺	×	↓	×	×
768.77	PC (33:1)	M+Na	×	×	↓	↓↓
778.78	PC (34:3)	M+Na ⁺	×	×	↓	↓
780.89	PC (34:2)	M+Na ⁺	×	↓	↓	↓
786.86	PC (35:6)	M+Na ⁺	×	↓	×	×
804.85	PC (36:4)	M+Na ⁺	×	↓	↓	↓
806.92	PC (36:3)	M+Na ⁺	×	↓	↓	↓
828.91	PC (38:6)	M+Na ⁺	×	×	↓	↓
854.91	PC (40:7)/ PC 39:0	M+Na ⁺⁺ / M+ Na	×	×	×	↓

↑ = aumentou após o choque térmico; ↑↑ aumentou mais de 2x; ↓ = diminuiu após o choque térmico; ↓↓ diminuiu mais de 2x × = não afetou

Considerando o perfil de proteínas, os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U apresentaram aumento da intensidade de sinal de algumas massas relacionadas a produção de energia (subunidades de citocromo c oxidase e de ATP sintase mitocondrial) após 24 h de infecção. Wang et al. (2007) também relataram o incremento de proteínas relacionadas à produção de energia, citocromo c oxidase e de ATP sintase mitocondrial subunidade beta, em camarões infectados com WSSV, e associou com a alta demanda de energia que o processo de infecção impõe aos animais.

Além disso, os tratamentos 0,5S:2U e 0,5S:4U apresentaram incremento do sinal de algumas massas específicas dentro da faixa de peptídeos antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos desempenham um importante papel no combate ao WSSV, sendo a sobre-expressão de algumas classes de peptídeos antimicrobianos observada em camarões com maior resistência à Mancha Branca (García et al. 2009; Woramongkolchai et al. 2011; Musthaq e Kwang 2014).

Tabela 5 Dados de MALDI-TOF MS referentes às proteínas diferencialmente moduladas ($P < 0.05$) nos hemócitos de camarões *L. vannamei* alimentados com as combinações 0,5%:1%, 0,5%:2% e 0,5%:4% de *Sargassum filipendula* e *Undaria pinnatifida*, respectivamente, e a dieta controle sem suplementação, após 24 h de infecção com WSSV.

Mass (Da)	Protein assignment*	Control	0.5S:1U	0.5S:2U	0.5S:4U
2301.66	-	×	×	↓	×
2325.06	-	×	×	↓	×
	NADH				
2373.50	dehydrogenase subunit 1 (2376 Da)	×	×	↓	×
2396.21	-	×	↓	↓	×
3483.16	-	×	×	×	↑
3647.92	ATPase subunit 8 (3646 Da)	×	×	×	↓
3953.81	ATPase subunit 6 (3990 Da)	×	↑	↑	↑
4155.99	-	×	×	×	↑
4177.04	-	×	×	×	↑
4218.30	-	×	×	×	↑
4470.36	Cytochrome oxidase subunit 1 (4469 Da)	×	×	×	↑
	Anti-				
4860.36	lipopolysaccharide factor (4833 Da)	×	×	↑	×
5258.63	Cytochrome oxidase subunit I (5258 Da)	↓	×	↑	↑
5275,75	-	↓	↑	↑	↑
5588,42	-	↑	↓	↑	↑
5728.89	Superoxide dismutase (5742 Da)		×	↓	↓
5855.87	-	↑	×	×	×
	Artemia mitochondrial				
6105.31	ATPase 6 gene (6092 Da); ATP synthase protein 8 (6116 Da)	×	×	↑	↑
6171.91	ATP synthase protein 8 (6171 and 6179 Da)	↑	↑	↓	↓
	ATP synthase F0 subunit 8 (6238 Da)/				
6244.77	Putative uncharacterized protein (6237 Da)	↑	↑	↑	↑
6355.66	Myosin light chain	↑	↑×	↑	×

	(6354 Da)/ATP synthase protein 8 (6354 Da)				
6495.44	-	×	×	↑	×
6606.27	Penaeidin-3a (6617.4 Da)	↓	↓	↓	↓
7421.59	Penaeidin-4c (7423 Da)	×	×	↑	×
7563.50	-	↑	×	↑	×
7696.10	Crustin isoform 2 (7686 Da)/Na ⁺ /H ⁺ exchanger (7690 Da)	×	×	×	↑
7879.67	-	↑	×	↑	×
8042.14	Sarcoplasmic calcium-binding protein 1 (8041 Da)	↓	×	×	×
8273.64	Penaeidin 3-2 (8297 Da)/ Penaeidin 3l	↓	×	↓	×
8967.41	Small heat shock protein (8966 Da)	×	↓	×	↓
9032.64	Phosphotransferase (9035 Da)	×	×	↓	×
9750.52	-	↓	↓	↓	×
10069.91	Cytochrome c oxidase subunit 1 (10066 Da)	↑	×	↑	×
10883.97	-	↑	×	↑	×
11018.37	Aquaporin (11015 Da)	×	×	↑	×
11056.91	Histone H3 (11042 Da)	×	×	↑	×
14199.40	Histone H3 (14193 Da)/Cytochrome b (14191 Da)/Cytochrome c oxidase subunit 1 (14204 Da)	×	×	×	↓

↑ = aumentou após o choque térmico; ↓ = diminuiu após o choque térmico; × = não afetou. *Proteínas com massa similar na base de dados UniProtKB para espécies de camarão

Em conclusão, o choque térmico e o desafio com WSSV provocaram profunda modulação nos perfis de lipídeos e proteínas dos hemócitos de *L. vannamei*, independente da dieta. Foi observado interação benéfica entre as duas espécies de algas pardas avaliadas, uma

vez que *S. filipendula* preveniu o efeito negativo da *U. pinnatifida* na resistência dos camarões ao choque térmico, e as combinações 0,5S:2U e 0,5S:4U aumentaram significativamente a resistência dos camarões ao desafio com WSSV.

Esses efeitos provocados pelas algas pardas sobre a resistência dos animais foram, provavelmente, causados por mudanças na fluidez da membrana, metabolismo dos lipídeos, metabolismo energético, resposta imune e defesa antioxidante. Portanto, a utilização da combinação dessas espécies de algas pardas apresenta elevado potencial no combate ao WSSV, pois melhora não só a resposta dos camarões à enfermidade, mas também aos seus mecanismos desencadeadores, tais como a variação de temperatura.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FAPESC (termo de outorga: 2015TR303), CAPES e CNPq. Somos gratos ao Gonzalo Soriano da Soriano SA. por fornecer gentilmente a biomassa seca de *Undaria pinnatifida*. Delano Dias Schleder recebeu bolsa da CAPES e licença para capacitação do Instituto Federal Catarinense – campus Araquari (IFCCA). Agradecemos as bolsas de produtividade pagas pelo CNPq aos pesquisadores Felipe Vieira e Leila Hayashi.

Referências

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1999) Official Methods of Analyses, 16th edn. OMA, Arlington.

APHA, American Public Health Association (1995) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA Inc, Baltimore.

Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, Jarzebinska J, Silberring J (2007) Methods for samples preparation in proteomic research. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 15:1-31.

Cárdenas JV, Gálvez AO, Brito LO, Galarza EV, Pitta DC, Rubin VV (2015) Assessment of different levels of green and brown seaweed meal in experimental diets for whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone) in recirculating aquaculture system. Aquacult Int 23:1491-1504.

Chotigeat W, Tongsupa S, Supamataya K, Phongdara A (2004) Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture 30:233-237.

Córcoles-Sáez I, Hernández ML, Martínez-Rivas JM, Prieto JA, Rande-Gil F (2016) Characterization of the *S. cerevisiae* inp51 mutant

links phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels with lipid content, membrane fluidity and cold growth. *Biochim Biophys Acta* 1861: 213-226.

Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG, Ricque-Merle D (2008) A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: Cruz-Suárez LE, Tapia-Salazar M, Nieto-López MG et al (eds.) *Avances en Nutrición Acuícola IX*, UANL, Monterrey, pp 304-333.

Cuthbertson BJ, Deterding LJ, Williams JG, Tomer KB, Etienne K, Blacksheara PJ, Büllsbache EE, Grosse PS (2008) Diversity in penaeidin antimicrobial peptide form and function. *Dev Comp Immunol* 32:167-181.

Fan L, Wang A, Wu Y (2013) Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J Proteomics* 80: 196-206.

Fleurence J., Morancçais M, Dumay J, Decottignies P, Turpin V, Munier M, Garcia-Bueno N, Jaouen P (2012) What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. *Trends Food Sci Tech* 27:57-61.

Francis TL, Maneveldt GW, Venter J (2008) Determining the most appropriate feeding regime for the south African abalone *Haliotis midae* Linnaeus grown on kelp. *J Appl Phycol* 20:597-602.

García JC, Reyes A, Salazar M, Granja CB (2009) Differential gene expression in White Spot Syndrome Virus (WSSV)-infected naïve and previously challenged Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 289:253-258.

Gong H, Lawrence AL, Jiang DH, Castille FL, Gatlin DM (2000) Lipid nutrition of juvenile *Litopenaeus vannamei* I. Dietary cholesterol and de-oiled soy lecithin requirements and their interaction. *Aquaculture* 190:305-324.

Harpaz S (2005) L-Carnitine and its attributed functions in fish culture and nutrition-a review. *Aquaculture* 249:3-21.

Harpaz S, Becker K, Blum R (1999) The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* - preliminary results. *J Therm Biol* 24: 57-62.

Hayward SAL, Manso B, Cossins AR (2014) Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. *J Exp Biol* 217:6-15.

Hermes-Lima M, Moreira DC, Rivera-Ingraham GA, Giraud-Billoud M, Genaro-Mattos TC, Campos EG (2015) Preparation for oxidative

stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. *Free Radical Bio Med* 89:1122-1143.

Hsieh YC, Chen YM, Li CY, Chang YH, Liang SY, Lin SY, Lin CY, Chang SH, Wang YJ, Khoo KH, Aoki T, Wang HC (2015) To complete its replication cycle, a shrimp virus changes the population of long chain fatty acids during infection via the PI3K-Akt-mTOR-HIF1 α pathway. *Dev Comp Immunol* 53: 85-95.

Huynh T, Yeh ST, Lin YC, Shyu JF, Chen LL, Chen JC (2011) White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immun* 31:286-293.

Immanuel G, Sivagnanavelmurugan M, Marudhupandi T, Radhakrishnan S, Palavesama A (2012) The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish Shellfish Immun* 32:551-564.

Jeon SB, Yoon HJ, Park SH, Kim IH, Park EJ (2017) Sulfatide, a major lipid component of myelin sheath, activates inflammatory responses as an endogenous stimulator in brain-resident immune cells. *J Immunol* 11:8077-8087.

Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, Mott JL, Gores GJ (2012) Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G77-G84.

Kandasamy S, Fan D, Sangha JS, Khan W, Evans F, Critchley AT, Prithiviraj B (2011) Tasco[®], a product of *Ascophyllum nodosum*, imparts thermal stress tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *Mar Drugs* 9:2256-2282

Kandasamy S, Khan W, Evans FD, Khan W, Evans F, Critchley AT, Prithiviraj B (2014) A fucose containing polymer-rich fraction from the brown alga *Ascophyllum nodosum* mediates lifespan increase and thermal-tolerance in *Caenorhabditis elegans*, by differential effects on gene and protein expression. *Food Funct* 5:275-284.

Kang HS, Lee SC, Park YS, Jeon YE, Lee JH, Jung SY, Park IH, Jang SH, Park HM, Yoo CW, Park SH, Han SY, Kim KP, Kim YH, Ro J, Kim HK (2011) Protein and lipid MALDI profiles classify breast cancers according to the intrinsic subtype. *Cancer* 11:1-9.

Kautsky N, Rönnbäck P, Tedengren M, Troell M (2000) Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. *Aquaculture* 191:145-161.

Kuhn-Nentwig L, Kopp LS, Nentwig W, Haenni B, Streitberger K, Schürch S, Schaller J (2014) Functional differentiation of spider hemocytes by light and transmission electron microscopy, and MALDI-MS-imaging. *Dev Comp Immunol* 43:59-67.

Lee Jr. RE, Damodaran K, Yi SX, Lorigan GA (2006) Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. *Cryobiology* 52:459-463.

Lee KW, Kim HS, Yun A, Choi DG, Jang BI, Kim HJ, Cho SH, Joo YI, Kim BH, Min BH (2016) Effect of the formulated diets on performance and resistance of juvenile abalone [*Haliotis discus* (Reeve, 1846)] subjected to various stress conditions. *J Shellfish Res* 35(2):481-491.

Lehmann M, Schleder DD, Guertler C, Perazzolo LM, Vinatea L (2016) Hypoxia increases susceptibility of Pacific white shrimp to white spot syndrome virus (WSSV). *Arq Bras Med Vet Zootec* 68:397-403.

Li C, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C227-C241.

Li Y, Wei L, Cao J, Qiu L, Jiang X, Li P, Song Q, Zhou H, Han Q, Diao X (2016) Oxidative stress, DNA damage and antioxidant enzyme activities in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) when exposed to hypoxia and reoxygenation. *Chemosphere* 144:234-240.

Los DA, Murata N (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta* 1666:142-157.

Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutania M, Aoki J (2009) Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostag Oth Lipid M* 89:135-139.

Malone AM, Cozzi RRF, Marshall WS (2015) Cold acclimation allows regulation of chloride secretion in a eurythermic teleost fish *Fundulus heteroclitus*. *Comp Biochem Physiol part A*. 180:68-74.

Munteanu BL, Von Reitzenstein C, Hänsch GM, Meyer B, Hopf C (2012) Sensitive, robust and automated protein analysis of cell differentiation and of primary human blood cells by intact cell MALDI mass spectrometry biotyping. *Anal Bioanal Chem*. 404:2277-2286.

Musthaq S, Kwang J (2011) Oral vaccination of baculovirus-expressed vp28 displays enhanced protection against white spot syndrome virus in *Penaeus monodon*. *PloSOne* 6:1-9.

Niu J, Chen X, Lu X, Jiang SG, Lina HZ, Liu YJ, Huang Z, Wang J, Wang Y, Tian LX (2015) Effects of different levels of dietary wakame

(*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. *Aquaculture* 435:78-85.

NRC, National Research Council (2011) *Nutrient Requirements of Fish and Shrimp*. National Academic Press, Washington.

Pádua D, Rocha E, Gargiulo D, Ramosa AA (2015) Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochem Lett* 14:91-98.

Poon IKH, Lucas CD, Rossi AG, Ravichandran KS (2014) Apoptotic cell clearance: basic biology and therapeutic potential. *Nature* 14: 166-180.

Pruitt NL (1990) Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. *J Therm Biol* 15:1-8.

Ratcliff JJ, Wana AHL, Edwards MD, Soler-Vila A, Johnson MP, Abreu MH, Morrison L (2016) Metal content of kelp (*Laminaria digitata*) co-cultivated with Atlantic salmon in an Integrated Multi-Trophic Aquaculture system. *Aquaculture* 450:234-243.

Richard N, Silva TS, Wulff T, Schrama D, Dias JP, Rodrigues PML, Conceição LEC (2016) Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: Associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. *J Proteomics* 142:1-14.

Rosa RD, Vergnes A, de Lorgeril J, Gonçalves P, Perazzolo LM, Sauné L, Romestand B, Fievet J, Gueguen Y, Bachère E, Destoumieux-Garzón D (2013) Functional divergence in shrimp anti-lipopopolysaccharide factors (ALFs): from recognition of cell wall components to antimicrobial activity. *PLoSone* 8:1-11.

Schleder DD, Blank M, Peruch LGB, Poli MA, Ferreira TH, Vieira FN, Hayashi L, Andreatta ER (2016) Protein and lipid profile of hemocytes from pacific white shrimp fed with *Sargassum filipendula* and submitted to thermal shock. *Latin American and Caribbean International Conference (LAQUA) 2016*

Schleder DD, Rosa JR, Guimarães AM, Ramlov F, Maraschin M, Seiffert WQ, Vieira FN, Hayashi L, Andreatta ER (2017a) Brown seaweeds as feed additive for white-leg shrimp: effects on thermal stress resistance, midgut microbiology, and immunology. *J Appl Phycol* doi:10.1007/s10811-017-1129-z

Schleder DD, Peruch LGB, Poli MA, Rosa KV, Pontinha V, Vieira FN, Andreatta ER, Hayashi L (2017b) Effects of brown seaweeds on marine shrimp resistance to White Spot Disease. 6th Congress of International Society for Applied Phycology (ISAP) 2017.

Smith VJ, Fernandes JMO, Kemp GD, Hauton C (2008) Crustins: Enigmatic WAP domain-containing antibacterial proteins from crustaceans. *Dev Comp Immunol* 32:758-772.

Strickland JD, Parsons TR (1984) A practical handbook of seawater analysis (Bulletin 167), 2nd edn. Unipub, Ottawa.

Sutter E, Oliveira AP, Tobler K, Schraner EM, Sonda S, Kaech A, Lucas MS, Ackermann M, Wild P (2012) Herpes simplex virus 1 induces *de novo* phospholipid synthesis. *Virology* 429:124-135.

Takahashi T, Suzuki T (2012) Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *J Lipid Res* 53:1437-1450.

Thanigaivel S, Chandrasekaran N, Mukherjee A, Thomas J (2016) Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. *Aquaculture* 464: 529-536.

Tomanek L (2014) Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *J Proteomics* 15: 92-106.

Verbruggen B, Bickley LK, van Aerle R, Bateman KS, Stentiford GD, Santos EM, Tyler CR (2016) Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. *Viruses* 8:1-29.

Wang HC, Wang HC, Leu JH, Kouc GH, Wang AHJ, Loc CF (2007) Protein expression profiling of the shrimp cellular response to white spot syndrome virus infection. *Dev Comp Immunol* 31:672-686.

Woramongkolchai N, Supungul P, Tassanakajon A (2011) The possible role of penaeidin5 from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, in protection against viral infection. *Dev Comp Immunol* 35:530-536.

Xia S, Zhao P, Chen K, Li Y, Liu S, Zhang L, Yang H (2012) Feeding preferences of the sea cucumber *Apostichopus japonicas* (Selenka) on various seaweed diets. *Aquaculture* 344-349:205-209.

Yamashita A, Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y Ito M, Oka S, Tanikawa T, Waku K, Sugiura T (2014) Acyltransferases and transacylases that determine the fatty acid composition of glycerolipids and the metabolism of bioactive lipid mediators in mammalian cells and model organisms. *Prog Lipid Res* 53:18-81.

Yangthong M, Hutadilok-Tawatana N, Thawonsuwan J, Phromkunthong W (2016) An aqueous extract from *Sargassum* sp. enhances the immune response and resistance against *Streptococcus iniae* in the Asian sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). *J Appl Phycol* 28: 3587-3598.

Yuan FH, Chen YG, Zhang ZZ, Yue HT, Bi HT, Yuan K, Weng SP, He JG, Chen YH (2016) Down-regulation apoptosis signal-regulating

kinase 1 gene reduced the *Litopenaeus vannamei* hemocyte apoptosis in WSSV infection. *Fish Shellfish Immun* 50:109-116.

Zhou Q, Zeng WP, Wang HL, Wang T, Wang YL, Xie FJ (2012) Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 364-365:252-258.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Os níveis de 0,5 e 2% de *S. filipendula* aumentaram a resistência dos animais ao choque térmico. Por outro lado, os níveis crescentes de *U. pinnatifida* resultaram em efeitos negativos na resistência.

A análise de MALDI-TOF revelou que a resistência ao choque térmico dos camarões alimentados com *S. filipendula* está relacionada ao aumento da fluidez da membrana e da defesa antimicrobiana, à redução do estresse oxidativo e da morte celular causada por estresse, e à modulação diferencial do metabolismo energético e da regulação do DNA.

O nível de 4% de *U. pinnatifida* incrementou a atividade das enzimas digestivas amilase e lipase, reduziu a contagem de *Vibrio* spp. no trato digestivo dos camarões, aumentou a atividade da enzima fenoxidase, ligada ao sistema imune, e a sobrevivência após infecção com WSSV.

O nível de 0,5% de ambas as algas incrementou a área de absorção de nutrientes do intestino dos camarões.

A adição dos diferentes níveis de ambas espécies de algas nas dietas não afetou o desempenho zootécnico dos camarões.

A combinação de ambas espécies de algas pardas na dieta demonstrou efeito benéfico em relação à resistência dos animais ao choque térmico e à infecção com WSSV.

A adição de 0,5% de *S. filipendula* foi capaz de evitar o efeito negativo da *U. pinnatifida*, entretanto, não foi suficiente para reduzir a mortalidade dos camarões em relação ao controle. As análises de MALDI-TOF revelaram que a mortalidade associada ao choque térmico está relacionada à redução na defesa antimicrobiana e antioxidante, indução da apoptose e problemas no ajuste da fluidez da membrana.

A combinação de ambas as algas nas dietas possibilitou a redução de 2% de *U. pinnatifida* sem prejudicar a resistência dos camarões ao desafio com WSSV. As análises de MALDI-TOF relacionaram essa resistência ao incremento de peptídeos antimicrobianos específicos, indução precoce da apoptose nos hemócitos e diminuição do suprimento de lipídeos requerido para montagem dos virions de WSSV.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALGAEBASE. *Sargassum filipendula* C.Agardh. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=D22769c1fb3be3231>. Acesso em: 05 julho 2017a.

ALGAEBASE. *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=Ba8cc0898a211d1f6&sk=60&from=results>. Acesso em: 05 julho 2017b.

AVNIMELECH, Yoram. **Biofloc Technology: a practical guide book**. 2 ed. Baton Rouge: The World Aquaculture Society, 2012. 272 p.

BALBOA, E. M. et al. *In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1764-1785, 2013.

BARRACCO, M. A. A. M.; PERAZZOLO, L. M.; ROSA, R. D. Avances en la Inmunología del Camarón. In: MORALES, V.; CUELLAR-ANGEL, J. **Guía técnica: Patología e Inmunología de Camarones Penaeidos**. 2. ed. Panamá, 2014. p. 237-308.

BORBA, M.; NOGUEIRA, J. Carcinicultura Brasileira: o perfil do setor em cada unidade federativa produtora em 2011. **Revista ABCC**, n. 2, p.26-29, 2013.

CARVALHO FILHO, J. Camanor se reinventa e lucra mesmo com o vírus da mancha branca. **Revista Panorama da Aquicultura**, n. 143, p. 45-51, 2014.

CHAKRABORTY, S. et al. Screening, isolation and optimization of anti-white spot syndrome virus drug derived from marine plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, p. S107-S117, 2014.

CHOWANSKI, S. et al. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 183, p. 57-63, 2015.

COSTA, S.W.et al. 2010. Parâmetros de cultivo e a enfermidade da mancha-branca em fazendas de camarões de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 45, n. 12, p. 1521-1530, 2010.

CRUZ-SUÁREZ, L. E. et al. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. In: CRUZ-SUÁREZ, L. E. et al. **Avances en Nutrición Acuicola IX, IX Simposio Internacional de Nutrición Acuicola**. Monterrey, UANL, 2008. p. 304-330.

FERNANDO, I. P. S.; NAH, J. W.; JEON, Y. J. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 48, p. 22–30, 2016.

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

FLEURENCE, J. et al. What are the prospects for using seaweed in human nutrition and for marine animals raised through aquaculture?. **Trends in Food Science & Technology**, v. 27, p. 57-61, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture**. Roma: FAO, 2016. 200 p.

FUJIKI, K., MATSUYAMA, H.; YANO, T. Protective effect of sodium alginates against bacterial infection in common earp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 17, p. 349-355, 1994.

GOMEZ-GIL, B.; ROQUE, A.; TURNBULL, J. F. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. **Aquaculture**, v. 191, n. 1-3, p. 259-270, 2000.

HARPAZ, S.; BECKER, K.; BLUM, R., The effect of dietary L-carnitine supplementation on cold tolerance and growth of the ornamental cichlid fish *Pelvicachromis pulcher* - preliminary results. **Journal of Thermal Biology**, v. 24, p. 57-62, 1999.

HAYWARD, S. A. L.; MANSO, B.; COSSINS, A. R. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 6-15, 2014.

HUYNH, T. et al. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, p. 286-293, 2011.

IMMANUEL, G. et al. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, p.551-564, 2012.

IR, P. et al. Transcriptional and metabolomic analysis of *Ascophyllum nodosum* mediated freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 13, n. 643, p. 1-23, 2012.

JACKSON, S. N.; WOODS, A. S. Direct profiling of tissue lipids by MALDI-TOFMS. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2822-2829, 2009.

KANDASAMY, S. et al. Tasco®, a product of *Ascophyllum nodosum*, imparts thermal stress tolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Marine Drugs**, v. 9, p. 2256-2282, 2011.

KANDASAMY, S. et al. A fucose containing polymer-rich fraction from the brown alga *Ascophyllum nodosum* mediates lifespan increase and thermal-tolerance in *Caenorhabditis elegans*, by differential effects on gene and protein expression. **Food & Function**, v. 5, p. 275-284, 2014.

KAUTSKY, N. et al. Ecosystem perspectives on management of disease in shrimp pond farming. **Aquaculture**, v. 191, p. 145-161, 2000.

KOBER, S. L. et al. Intact cell mass spectrometry as a rapid and specific tool for the differentiation of toxic effects in cell-based ecotoxicological test systems. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 7721-7731, 2015.

LEE JUNIOR., R. E. et al. Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. **Cryobiology**, v. 52, p. 459-463, 2006.

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

LIU, L. et al. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and Pharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 591-619, 2012.

MALONE, A. M.; COZZI, R. R. F.; MARSHALL, W. S.; Cold acclimation allows regulation of chloride secretion in a eurythermic teleost fish *Fundulus heteroclitus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 180, p. 68-74, 2015.

MILLEDGE, J.J., NIELSEN, B.V., BAILEY, D., 2016. High-value products from macroalgae: the potential uses of the invasive brown seaweed, *Sargassum muticum*. **Rev Environ. Sci. Biotechnol.** 15, 67–88.

MOHAMED, S.; HASHIM, S. N.; RAHMAN, A. Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. **Trends in Food Science & Technology**, v. 23, p. 83-96, 2012.

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, p. 247-250, 2012.

MUSTHAQ, S.; KWANG, J. Oral Vaccination of Baculovirus-Expressed VP28 Displays Enhanced Protection against White Spot Syndrome Virus in *Penaeus monodon*. **PloSOne**, v. 6, n. 11, p. 1-9, 2011.

NIU J. et al. Effects of different levels of dietary wakame (*Undaria pinnatifida*) on growth, immunity and intestinal structure of juvenile *Penaeus monodon*. **Aquaculture**, v. 435, p.78-85, 2015.

PÁDUA, D. et al. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. **Phytochemistry Letters**, v. 14, p. 91-98, 2015.

PENG, J. et al. Identification of cold responsive genes in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridization. **Gene**, v. 575, p. 667-674, 2016.

POERSCH, L.H.; FÓES, G.; KRUMMENAUER, D.; Romano, L.A.; WASIELESKY JUNIOR, W. Bioflocos uma alternativa para camarões saudáveis Fazenda catarinense volta a operar com sucesso em área afetada pelo vírus da mancha branca. **Revista Panorama da Aquicultura**, n. 130, p. 28-37, 2012.

PONCE-PALAFIX, J.; MARTINEZ-PALACIOS, C. A.; ROSS, L. G. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. **Aquaculture**, v. 157, p. 107-115, 1997.

PRUITT, N.L. Adaptations to temperature in the cellular membranes of crustacea: membrane structure and metabolism. **Journal of Thermal Biology**, v. 15, p. 1-8, 1990.

RICHARD, N. et al. Nutritional mitigation of winter thermal stress in gilthead seabream: Associated metabolic pathways and potential indicators of nutritional state. **Journal of Proteomics**, v. 142, p. 1-14, 2016.

SANCHEZ-PAZ, A. White spot syndrome virus: an overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, v. 41-43, p. 1-34, 2010.

SANJEEWA, K.K.A. et al. Bioactive properties and potentials cosmeceutical applications of phlorotannins isolated from brown seaweeds: A review. **J. Photoch. Photobio. B.** 162, 100-105.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-16, 2015.

SINURAT, E.; MARRASKURANTO, E. Fucoïdan from brown seaweed and its bioactivity. **Squalen**, v. 7, n. 3, p. 131-138, december. 2012:

SUSANTO, E. et al. Lipids, fatty acids, and fucoxanthin content from temperate and tropical brown seaweeds. **Aquatic Procedia**, v. 7, p. 66-75, 2016.

TEETS, N. M.; DENLINGER, D. L. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. **Physiological Entomology**, v. 38, p. 105-116, 2013.

THANIGAIVEL, S. et al. Seaweeds as an alternative therapeutic source for aquatic disease management. **Aquaculture**, v, 464, p. 529-536, 2016.

THITAMADEE, S. et al. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia. **Aquaculture**, v. 452, p. 69-87, 2016.

TOMAZELLI JUNIOR, O. et al. Effect of *Cynodon dactylon* extract on white spot virus-infected *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture International**, v. 25, p. 1107-1122, 2017.

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, p 45-55, 2013.

VAN DOAN, H. et al. Effects of low molecular weight sodium alginate on growth performance, immunity, and disease resistance of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 55, p.186-194, 2016.

VERBRUGGEN, B. et al. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments. **Viruses**, v. 8, p. 1-29, 2016.

VIEIRA, F. do N. et al. Primeiro cultivo de camarão marinho em sistema intensivo realizado na fazenda experimental Yakult/UFSC. In: Simpósio Internacional de Carcinicultura, 11., e Simpósio Internacional de Aquicultura, 8., 2014, Fortaleza. **Anais...**[S. I.]ABCC, p. 40.

WU, L. et al. A review about the development of fucoidan in antitumor activity: Progress and challenges. **Carbohydrate Polymers**, v. 154, p. 96-111, 2016.

YANCEY, P. H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. **The Journal of Experimental Biology**, v. 208, p. 2819-2830, 2005.