

Cecília de Souza Valente

**TRANSCRIÇÃO DE GENES DE DEFESA E MICROBIOMA
INTESTINAL NO CAMARÃO MARINHO, *Litopenaeus vannamei*,
FRENTE AO VÍRUS DA MANCHA BRANCA EM SISTEMA DE
BIOFLOCOS E ÁGUA CLARA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Aqüicultura da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em
Aqüicultura.

Orientadora: Profa. Maria Risoleta Freire Marques

Florianópolis
2018

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

Valente, Cecília de Souza

Transcrição de genes de defesa e microbioma intestinal no camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, frente ao vírus da mancha branca em sistema de bioflocos e água clara / Cecília de Souza Valente; orientadora, Maria Risoleta Freire Marques, 2018.

166 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Bioflocos. 3. *Litopenaeus vannamei*. 4. Microbioma intestinal. 5. WSSV. I. Maria Risoleta Freire Marques. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

III. Título.

Transcrição de genes de defesa e microbioma intestinal no camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*, frente ao vírus da mancha branca em sistema de bioflocos e água clara

Por

CECÍLIA DE SOUZA VALENTE

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.



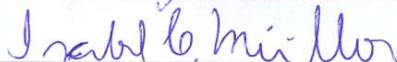
Profª. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

Banca Examinadora:



Dra. Maria Risoleta Freire Marques – *Orientadora*

Dr. Edeimar Roberto Andreatta - UFSC



Dra. Isabel Cristina Muller



Dr. José Luiz Pedreira Mouriño - UFSC



Prawns and mussels

Vincent van Gogh, 1886

Vincent van Gogh Museum, Amsterdam

(Vincent van Gogh Foundation)



Camarão marinho de vida livre

Luiz Carlos Valente Junior (fotógrafo), 2017

A minha família, amor, suporte e base.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Senhor e Criador.

A minha família. Ao meu esposo Luiz, pelo amor, apoio e incentivo. A meus pais Josefina e Nilzo, por todo o suporte em orações incessantes e amor. A meu irmão Eduardo, pelo carinho e amor. A meus avós (*in memoriam*) por terem acreditado desde sempre.

A Prof^a Dr^a Maria Risoleta, por ter me concedido a oportunidade, acreditado em mim e por toda a valiosa orientação e dedicação.

Ao Prof Dr Felipe Vieira, pelo apoio, suporte e paciência durante o experimento.

Ao Prof Dr Daniel Merrifield, pela oportunidade de estudos em seu laboratório.

Aos membros da banca avaliadora, Dr^a Isabel Müller, Dr José Luiz Mouriño e Dr Edegar Andreatta, pelas ricas contribuições.

Ao Carlito pela constante solicitude. Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade.

A todos do Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica e do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola da UFSC. Em especial, à Karla Ortiz, companheira por todo o tempo, pelos muitos sorrisos e bom humor; ao Luiz Vilas Bôas, pelo auxílio durante a coleta e pelas excelentes discussões; a Ana Paula Fraga, por todo o conhecimento compartilhado e ensino de técnicas; a Laura Freitas, por toda a ajuda; a Juliana Tisca e Diego Nogueira, pela valiosa instrução em estatística; a Gustavo Bachmann, Josele Redig, Lucas Takinami, Mateus Alencar e Rachel Depperschmidt, pela parceria no tempo em que trabalhamos juntos; ao Seu Keka, pela alegria de sempre.

A toda equipe do Laboratório de Camarões Marinhos da UFSC, imprescindíveis para o desenvolvimento do experimento. Primordialmente, à Nicole Correa, pela ajuda com as análises de qualidade de água; à Fernanda Fernandes, pelos esclarecimentos; ao Carlos Miranda, pela confecção da bomba de aeração para o transporte

dos bioflocos e pela organização de nossa sala de experimentos; ao Davi, que muitíssimo auxiliou e ensinou o correto manejo; Ao Ilson e Dimas, que auxiliaram durante o experimento; ao Seu Chico, pela gentileza em transportar o bioflocos.

Ao grupo de pesquisadores da University of Plymouth, pela oportunidade inestimável. Particularmente à Ana Rodiles, pela disponibilidade; à Gabriella Pereira, pelo imensurável suporte e ensino; à Marcela Maia, pela ajuda e companheirismo; ao Kurt Servin, pela força e amizade; ao Matthew Emery, pelo uso do laboratório.

A todos que deram suporte e acreditaram. Meu sincero agradecimento, não faria nada sem cada um de vocês.

Deus faz coisas *tão* grandiosas que se não podem esquadrinhar;
e tantas maravilhas que se não podem contar.

Elifaz a exortar Jó,
citado em Jó 5:9.

RESUMO

A produção de camarão em sistema com bioflocos (BFT) mostra-se como uma alternativa sustentável e economicamente viável. Impulsionado pela ocorrência de enfermidades virais na carcinicultura, o emprego deste sistema de cultivo, considerado como mais biosseguro, está presente em diversos países produtores, inclusive no Brasil. Entre seus aspectos positivos estão a reciclagem da água, reuso contínuo de nutrientes, diminuição do impacto ambiental e fonte adicional de alimento. Neste estudo foram avaliadas algumas respostas moleculares de defesa no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, mantido em BFT, após desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca, WSSV. Paralelamente, foi investigado o possível efeito da infecção viral sobre o perfil da microbiota intestinal dos camarões e sua relação com a microbiota aquática do sistema de cultivo. Espécimes juvenis (n=168) foram aclimatados por 15 dias, sendo 84 camarões mantidos em tanque com água clara (ACT), em um volume de 500 L, com renovação contínua, e 84 em tanque com BFT maduro, com capacidade para 1000 L, com troca zero de água. Após aclimação, os camarões de ambos os sistemas foram individualmente desafiados com o WSSV, por meio de um inóculo contendo uma carga viral média ($5,3 \times 10^4$ vírus.ml/camarão), enquanto outros foram injetados com solução salina estéril (grupo controle). Hepatopâncreas, intestino, brânquias e hemócitos foram coletados na pré-infecção e 48h pós-infecção. A quantificação do número de transcritos dos genes alvo foi realizada através de PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR). O número de transcritos dos genes *QM* e *Ran*, envolvidos diretamente com as respostas celulares de defesa, foi significativamente maior ($p < 0,05$) nos camarões infectados com WSSV, em comparação aos não infectados. Em particular, o aumento de transcritos de *QM* foi relacionado à infecção pelo WSSV, independentemente do tecido ou do sistema de cultivo. Com base nos genes alvo analisados, em 48h pós-infecção, o hepatopâncreas foi considerado o tecido mais responsivo quanto ao perfil de transcritos. Embora tenhamos observado maior mortalidade entre os camarões mantidos em BFT, em relação àqueles mantidos em ACT, os níveis de transcritos foram semelhantes entre os camarões não infectados, mantidos nesses dois sistemas. A caracterização do perfil da microbiota intestinal dos camarões, assim como da microbiota da água, frente à infecção com o WSSV, foi baseada na amplificação de seqüências alvo de regiões hipervariáveis do gene *16S rRNA*, seguida da

análise de sequenciamento de nova geração, NGS (*Next Generation Sequencing*). O WSSV foi capaz de interferir no equilíbrio do microbioma intestinal de *L.vannmei*, sendo este efeito mais evidente nos camarões mantidos em ACT. Após a infecção viral, houve prevalência de *Cetobacterium* spp, independentemente do sistema (BFT ou ACT) e queda significativa ($p<0,05$) de *Bacillus* spp nos animais mantidos em ACT. Não foi observada relação entre a microbiota intestinal e a microbiota da água, nos níveis de Filo e Gênero. Observamos que, apesar de biosseguro, com a introdução do WSSV no BFT, a mortalidade dos camarões ocorreu em um intervalo de tempo mais curto, tendo sido mais elevada, em relação ao sistema ACT. Nossos resultados respaldam e reforçam a relevância da caracterização do perfil diferencial de transcritos de genes do hospedeiro mobilizados frente à infecção pelo WSSV, assim como evidenciam a interferência da infecção viral na microbiota intestinal de *L. vannamei* e a relevância das características inerentes a cada sistema de cultivo.

Palavras-chave: Aquicultura; Bioflocos; *Litopenaeus vannamei*; Microbioma intestinal; WSSV.

ABSTRACT

Shrimp farming with biofloc is viewed as a sustainable and economically viable alternative of production. Due to the impact of viral diseases in shrimp farming, biofloc technology (BFT) can contribute to biosecurity and is already present in many countries, including Brazil. It relies on continuous recycling of water and reuse of nutrients, besides minimizing environmental impact and serving as additional food source. In the present study, some molecular defense responses were evaluated in juvenile shrimp *Litopenaeus vannamei* kept in BFT, after challenge with White Spot Syndrome Virus (WSSV). A putative effect of viral infection on the intestine microbiota of these shrimp was investigated, along with its relation to the aquatic microbiota present in the cultivation system. Shrimps (n=168) were acclimated for 15 days, 84 individuals in a tank with 5000 L of clear sea water (CSW), with water being continuously renewed, whereas other 84 in a 1000L tank with BFT, with zero water exchange. After acclimation, shrimp were either individually challenged with WSSV, using an inoculum with a medium virus load (5.3×10^4 virus.ml/shrimp), or injected with sterile saline solution. Hepatopancreas, intestine, gills and hemocytes were sampled before (preinfection) and 48h post-infection. The number of transcripts for target genes was determined using quantitative Real Time PCR (qRT-PCR). *QM* and *Ran*, genes directly involved in cellular defense response, were up-regulated ($p < 0.05$) in WSSV infected shrimp. Noteworthy, levels of *QM* transcripts could be directly related to viral infection, depending neither of tissue nor cultivation system. Overall, hepatopancreas showed to be the most responsive tissue at 48 h post-infection. Although shrimp mortality was higher in BFT in comparison to CSW, levels of transcripts were similar in non-infected shrimp in both systems. The characterization of shrimp intestinal microbiota, as well as that of water, upon WSSV challenge, was based on the amplicons from hypervariable regions within the *16S rRNA gene*, followed by Next Generation Sequencing (NGS). WSSV was able to interfere in the equilibrium of *L.vannamei* intestinal microbiota, particularly in shrimp kept in CSW. Upon viral infection, *Cetobacterium* spp prevailed in both, BFT and ACT, whereas *Bacillus* spp diminished in CSW ($p < 0.05$). Moreover, we observed no relation between intestinal and water microbiota. We point out that once WSSV became present in BFT, shrimp mortality was not only higher but was seen earlier in comparison to CSW. Therefore, the relevance of addressing differential

transcript levels of shrimp genes recruited upon viral infection is further supported with our findings. Moreover, we showed that WSSV affects *L.vannmei* intestinal microbiota and also that the characteristics of each cultivation system are relevant.

Keywords: Aquaculture; Biofloc; *Litopenaeus vannamei*; Intestinal microbiome; WSSV.

LISTA DE FIGURAS INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1:** Mapa indicando a origem e área de distribuição geográfica do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*..... 32
- Figura 2:** Espécime adulto de *Litopenaeus vannamei* mantido em água clara 32
- Figura 3:** Novo mapa de distribuição do *Litopenaeus vannamei*, após sua dispersão mundial 33
- Figura 4:** Composição de flocos microbianos secos..... 37
- Figura 5:** Espécimes de *Litopenaeus vannamei*. Em A.: animais não infectados mantidos em água clara. Em B.: animal infectado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), mantido em água clara 44
- Figura 6:** Transporte de camarões vivos entre fronteiras..... 46
- Figura 7:** Representação gráfica da comunidade bacteriana descrita em água marinha e em água doce. Alpha, Gamma e Delta referem-se às classes do filo Proteobacteria 54
- Figura 8:** Diagram de Sneizko Venn mostrando a interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente 58

CAPÍTULO 1

- Figura 1:** Esquema ilustrativo do desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em *Litopenaeus vannamei*, mantidos em dois sistemas experimentais, i.e., bioflocos e água clara 70
- Figura 2:** Perfil comparativo do nível de transcritos de genes alvo em *Litopenaeus vannamei*, entre sistemas distintos, i.e., bioflocos (BFT) e água clara (ACT), 48h após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) 77

Figura 3: Taxa de sobrevivência (%) de *Litopenaeus vannamei* após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).....78

Figura 4: Gráficos do perfil quantitativo do número de transcritos em diferentes tecidos, i.e., hepatopâncreas, brânquias e hemócitos, após 48h do desafio de *Litopenaeus vannamei* com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)83

CAPÍTULO 2

Figura 1: Linha do tempo representativa do desenho experimental utilizado para o desafio dos camarões *Litopenaeus vannamei* com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).....106

Figura 2: Taxa de sobrevivência (%) de *Litopenaeus vannamei*, após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)110

Figura 3: Curvas de rarefação para as bibliotecas 16S rRNA bacterianas. Em **a** – Curvas que indicam a riqueza de espécies (Curvas do índice Chao1). Em **b**- Curvas que indicam diversidade de espécies (Curvas do índice Shannon).....113

Figura 4: Abundância relativa da composição da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante (água clara tratada - ACT, e bioflocos - BFT). Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Filo.....115

Figura 5: Abundância relativa da composição da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante (água clara tratada - ACT, e bioflocos - BFT). Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos dos Gêneros.....118

Figura 6: Resultados do método LefSe utilizado na análise do microbioma intestinal de *Litopenaeus vannamei*, mostrando Táxons distintos em nível de Gênero, para as classes bioflocos (BFT) e água clara (ACT). Os táxons listados foram significativamente enriquecidos nas respectivas classes ($p < 0,05$; teste de Kruskal-Wallis).....120

Figura 7: Diagramas de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), mostrando a correlação entre a comunidade bacteriana no intestino de *Litopenaeus vannamei* e a água circundante (bioflocos ou água clara), antes e após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)... 122

Figura 8: Diagrama de Venn indicando OTUs (*Operational Taxonomic Units*) singulares e compartilhadas, em nível de Gênero, em intestino de *Litopenaeus vannamei* mantidos em água clara (ACT) ou bioflocos (BFT), antes e após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)..... 124

LISTA DE TABELAS INTRODUÇÃO GERAL

- Tabela 1:** Comparação entre quatro diferentes sistemas de carcinicultura, baseado em densidade, produção e parâmetros operacionais..... 36
- Tabela 2:** Micro-organismos com possível ação probiótica em crustáceos 59

CAPÍTULO 1

- Tabela 1:** Sequência dos iniciadores utilizados para RT-*q*PCR..... 73
- Tabela 2:** Quantificação viral em camarões, *Litopenaeus vannamei*, determinada através de RT-*q*PCR, após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). **I** – Carga viral (WSSV) em amostras de pleópodes de camarões mantidos em água clara tratada (ACT) e em bioflocos (BFT), em 48 e 72h pós-infecção. **II** – Carga viral (WSSV) em amostras de água de ACT e BFT e em sedimento de BFT 79
- Tabela 3:** Níveis de transcrição de genes alvo em brânquias, hemócitos e hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei*, mantidos em bioflocos e água clara, após 48h de desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Os números quantificam em número de vezes a diferença na transcrição gênica em relação ao gene referência (*rRNA 18S*)..... 81

CAPÍTULO 2

- Tabela 1:** Resumo da análise dos dados obtidos a partir do sequenciamento de nova geração (NGS) em amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei* e amostras de água dos aquários de água clara e bioflocos, antes e após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) 112
- Tabela 2:** Identificação de bactérias com potencial zoonótico e/ou potencial patogênico para humanos na água dos tanques

experimentais (bioflocos, BTF, e água clara, ACT), e em amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei*, pré-infecção, e após infecção pelo vírus da mancha branca (WSSV)126

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCC Associação Brasileira de Criadores de Camarão

BFT *Biofloc Technology System* / Tecnologia de Bioflocos

BWSS *Bacterial White Spot Syndrome* / Síndrome da Mancha Branca Bacteriana

CABI *Invasive Species Compendium* / Compêndio de Espécies Invasoras

cDNA DNA complementar

CTAB Brometo de Cetil-Trimetil Amônio

DNA Ácido desoxirribonucleico

ERO Espécies Reativas de Oxigênio

FAO *Food and Agriculture Organization* / Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

GAPDH Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HHNBV *Hepatopietic Necrosis Baculovirus*

NaCl Cloreto de sódio

N₂ Nitrogênio molecular **NH₃** Amônia não ionizada **NH₄⁺** Íon amônio

NO₂⁻ Nitrito

NO₃⁻ Nitrato

O₂⁰⁻ Ânion superóxido

OIE *World Organization for Animal Health* / Organização Mundial de Saúde Animal

ORF *Open Reading Frame* / Janela aberta de leitura

p Nível de probabilidade

PAM Proteínas / peptídeos antimicrobianos

PAMPs Padrões moleculares associados a patógenos

PCR Reação em cadeia da polimerase

pH Potencial hidrogeniônico

ppm Parte por milhão

PRDV *Penaeid Rod-shaped DNA Virus*

proPO Pró-fenoloxidase

qPCR PCR quantitativa em tempo real **Relação C:N** Relação carbono:nitrogênio **RNA** Ácido ribonucleico

RNAi RNA de interferência

rRNA RNA ribossomal ou RNA ribossômico

SDS Dodecil Sulfato de Sódio

SEED *Shrimp Explosive Epidermic Disease*

SOD Superóxido Dismutase

SSH Biblioteca subtrativa supressiva

TE Tampão Tris-HCl + EDTA

UV radiação ultravioleta

VNTRs *Variable Number of Tandem Repeats* / mini-satélites ou repetição em *tandem* de número variável

WSBV *White spot syndrome baculovirus complex*

WSD *White Spot Disease* / Síndrome da Mancha Branca (no presente trabalho, refere-se à doença associada à presença do WSSV)

WSSV *White Spot Syndrome Virus* / Vírus da Síndrome da Mancha Branca

ZEAH *Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic Culture System* / *Sistema Aeróbico Heterotrófico* com Troca Zero de Água

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	27
1. Carcinicultura.....	27
2. Crustáceos decápodes.....	29
3. Camarão branco do Pacífico.....	31
4. Sistema de bioflocos.....	35
5. Síndrome da Mancha Branca	41
6. Respostas de defesa e transcrição gênica frente à infecção viral ...	48
7. Comunidade bacteriana do ambiente aquático	53
8. Microbioma intestinal, probióticos e identificação de micro-organismos	55
9. Contextualização e justificativa do presente estudo	61
10. Objetivos	64
CAPÍTULO 1	65
1. Introdução	66
2. Material e Métodos	68
3. Resultados	76
4. Discussão	85
5. Conclusão.....	94
6. Agradecimentos.....	94
7. Conflito de interesses	94
8. Referências.....	95
CAPÍTULO 2	101
1. Introdução	102
2. Material e Métodos	104
3. Resultados	109
4. Discussão	128
5. Conclusão.....	135
6. Agradecimentos.....	136
7. Conflito de interesses	136
8. Referências.....	137
CONCLUSÕES GERAIS	145
REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL	147
APÊNDICE	163
ANEXO	165

INTRODUÇÃO GERAL

1. Carcinicultura

Devido à crescente demanda mundial por alimentos e à exploração dos estoques pesqueiros, a aquicultura mostra-se como uma alternativa viável para o suprimento de proteína de origem animal, com segurança alimentar, e gerando favorável movimentação financeira. Ademais, a atividade contribui para a conservação dos animais de vida livre. Para o ano de 2030, projeta-se uma produção mundial de 186 milhões de toneladas de pescado (21,8 milhões de toneladas na América Latina), igualando-se em participação a aquicultura e a pesca (The World Bank, FAO, 2013). Das aproximadamente 580 espécies animais produzidas pela aquicultura, em torno de 60 são de crustáceos. De acordo com a FAO (2016), no ano de 2014 houve uma produção mundial de 6,9 milhões de toneladas de crustáceos, tendo sido a China responsável por 57,75% da carcinicultura mundial. Neste mesmo ano, o Brasil foi o 10º produtor mundial de crustáceos, fornecendo 65,1 mil toneladas. São previstos, para o ano de 2030, uma produção mundial entre 11,2 e 12,3 milhões de toneladas de camarão, com possibilidade de 15% de retração, caso ocorra alguma epidemia ou pandemia (The World Bank, FAO, 2013).

Ademais, de acordo com dados apresentados pelo diretor do Instituto de Sistemas Alimentares Sustentáveis da Universidade da Flórida (IFAS), Estados Unidos, James Anderson, durante a conferência da Aliança Global da Aquicultura (GOAL) em 2016, realizada na cidade de Guangzhou, China, projeta-se um crescimento anual para a produção global de camarão de cultivo na ordem de 4,2% de 2015 a 2018 (4,1 milhões de toneladas em 2016 para 4,5 milhões de toneladas em 2018). No caso da América Latina, esta projeção aponta um crescimento significativo no caso do Equador, enquanto estima-se que os níveis de produção no Brasil ao fim deste período devam permanecer praticamente iguais aos registrados em 2015 (GOAL, 2016).

A história da carcinicultura teve início no sudeste asiático séculos atrás, quando criadores de peixe produziram camarão marinho acidentalmente no mesmo tanque que o pescado. Já a moderna carcinicultura iniciou-se por volta de 1930, também na Ásia, especificamente no Japão, com a espécie *Marsupenaeus japonicus* (Jory; Cabrera, 2012). No Brasil, a produção de camarão iniciou-se nos anos 1970, no Rio Grande do Norte, com o “Projeto Camarão”. Neste mesmo período, Santa Catarina também iniciou sua produção, com foco

na reprodução, larvicultura e engorda de animais. Nos anos 1990, os laboratórios brasileiros dominaram a reprodução e a larvicultura da espécie *Litopenaeus vannamei*, consolidando sua viabilidade comercial e de produção (ABCC, 2011).

Atualmente, o cultivo de *L.vannamei* responde por cerca de 80% de toda a produção mundial de camarão marinho. No período entre 2006 e 2015, a produção mundial desta espécie de peneídeo registrou, em média, um crescimento anual na ordem de 9% (FAO, 2015). Nas Américas, a carcinicultura está baseada quase inteiramente sobre a produção do camarão branco do Pacífico (Lightner, 2001). Os maiores produtores americanos são Equador, México e Brasil.

No ano de 2014, o Brasil produziu 65,1 mil toneladas de camarões marinhos, em uma área de 23 mil hectares voltados para a carcinicultura. Os maiores produtores nacionais encontram-se na Região Nordeste, a qual, entre 2015 e 2016, deteve 99,3% da produção brasileira, destacando-se os estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí. Seguiram-se a Região Sul com 0,5% da produção, Região Norte com 0,09% e Região Sudeste com 0,07%. Não há registo neste período referente à Região Centro-Oeste (IBGE, 2016). A respeito do mercado brasileiro consumidor, há ainda uma grande margem de crescimento, visto que o brasileiro consome somente 0,6 kg per capita ao ano de camarão (Rocha, 2016).

Dentre os desdobramentos positivos da carcinicultura, além do evidente ganho financeiro direto, podemos citar a geração de empregos diretos e indiretos; o suprimento de proteína animal de alta qualidade sanitária e nutricional; o aproveitamento de vastas áreas de terras costeiras anteriormente não utilizadas e/ou inadequadas para outros tipos de produção; a produção de *commodity* com valor agregado; e a participação na dinâmica do comércio internacional (Jory; Cabrera, 2012).

Contudo, a aquicultura pode enfrentar dificuldades, principalmente ao lidar com enfermidades. Dentre as doenças infecciosas que afetam os animais marinhos, 34% têm origem bacteriana, 25% viral, 19% protista e 18% por metazoários (Laffert et al., 2015). As doenças impactam negativamente a dinâmica econômica da produção de algumas maneiras:

- Causando a redução na produção: queda de produtividade, aumento da mortalidade animal, queda na taxa de crescimento;
- Gerando gosto ou aparência desagradáveis devido, principalmente, à melanização, não aceitos pelo consumidor;

- Constituinto risco para saúde pública, em alguns casos.

Por outro lado, há ainda que se considerar a possibilidade de uma patologia na produção ao se tornar um surto, devido à alta densidade de estocagem vir, potencialmente, a se disseminar, contaminando o ambiente e atingindo a população selvagem (Lotz; Overstreet; Grimes, 2005). Assim sendo, tanto em relação ao impacto na produção, quanto ao potencial impacto no ambiente, recomenda-se a associação entre as boas práticas de manejo e o monitoramento sanitário preventivo, aliados ao emprego de medidas biosseguras nos cultivos.

A “Revolução Verde”, em referência à transformação ocorrida na agricultura devido ao aumento da produtividade por meio do uso de tecnologia, ocorrida nas décadas seguintes à Primeira Guerra Mundial, transformou e inovou a produção agrícola ao redor do mundo. Nos últimos anos, tem-se apresentado uma nova ideia de transformação, porém diretamente relacionada à aquicultura: a “Revolução Azul” (Lucas, 2012). Ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento, a “Revolução Azul” caracteriza a aquicultura como uma produção sustentável, com inúmeras espécies que continuam sendo domesticadas e produzidas em cativeiro, representando uma ferramenta para alimentação humana, vantagem econômica e sustentabilidade. As novas tecnologias de produção, como o sistema de bioflocos, por exemplo, combinam sustentabilidade e inovação.

2. Crustáceos decápodes

Conhecer os aspectos biológicos dos animais cultivados envolve melhor entender sua fisiologia e seu comportamento para, deste modo, melhor caracterizar o sistema de produção no qual os mesmos serão criados. Este conhecimento resulta em bem-estar animal, diminuição de estresse e manutenção dos sistemas de defesa e, consequentemente, aumento nos índices de produção.

Crustáceos são encontrados associados ao zooplâncton, no mar profundo e em regiões costeiras. São, inclusive, os organismos dominantes nos ecossistemas aquáticos subterrâneos. Pertencentes ao filo Artropoda, subfilo Crustacea e classe Malacostraca, a ordem Decapoda é caracterizada por cinco pares de patas (pereópodes) que são os apêndices dos últimos cinco segmentos torácicos (Miller; Harley, 2010). Os decápodes representam uma alta parcela de espécies dos crustáceos (dados na literatura variam entre 10 mil e 18 mil

espécies) e são considerados os crustáceos mais avançados em termos de comportamento animal, devido à diversidade comportamental no grupo (Noga; Hancock; Bullis, 2006; Brusca; Moore; Shuster, 2016). Pertencem a esse grupo, os camarões, as lagostas, e os caranguejos. Dentre os camarões, já foram descritas centenas de espécies, sendo, atualmente, 12 espécies de interesse comercial.

Dentre os crustáceos de interesse comercial, a maioria é utilizada para a produção de proteína animal, sendo que algumas espécies também são criadas como espécies ornamentais para aquários marinhos ou de água doce, ou ainda, para exposição em zoológicos (Cato; Brown, 2003). Os crustáceos representam uma significativa proporção de biomassa e espécies em ambientes aquáticos, sendo constituintes importantes para a totalidade do ecossistema aquático. Como decápodes de interesse comercial, podemos citar os camarões, as lagostas, os caranguejos e os lagostins (Noga; Hancock; Bullis, 2006).

Como características anatômicas e fisiológicas, os decápodes possuem corpo segmentado e esqueleto externo, chamado exoesqueleto, o qual é constituído de quitina e impregnado por sais de cálcio, e possibilita o crescimento por meio de mudas (ecdise); a cabeça e o tórax são protegidos por uma carapaça, a qual se estende lateralmente para proteção das brânquias; com respiração branquial e sistema circulatório semi aberto, o fluido corporal é chamado de hemolinfa, não havendo separação entre os sistemas circulatório e linfático. Especificamente em camarões, o rostro possui dentes nas partes ventral e dorsal e as brânquias localizam-se no último segmento torácico (Brusca; Moore; Shuster, 2016).

Em relação ao comportamento de camarões, seus padrões de atividades são influenciados pelos ciclos de marés e pela intensidade luminosa; apresentam comportamento de camuflagem, muito provavelmente para reduzir sua predação, visto serem presas de peixes e pássaros; estes comportamentos podem estar associados ao grande número de fotorreceptores especializados em cores (dezesseis ao total, sendo doze para cor), sendo possível inferir que a constância da cor no ambiente é particularmente importante para estes animais (Ruppert; Fox; Barnes, 2004; Bradburry; Vehrencapm, 2011). Suas estratégias de alimentação vão desde a busca do alimento em suspensão, passando pela varredura do substrato, até a predação. Seus pleópodes são usados para nadar e escavar. Para uma rápida e vigorosa movimentação para trás, flexionam rapidamente a parte ventral do abdômen. O comportamento canibal pode ser observado em momentos de estresse, tais como agrupamento com alto número de indivíduos, falta de alimento, baixa

qualidade da água e ocorrência de enfermidades (Fish; Fish, 2011; Brusca; Moore; Shuster, 2016).

3. Camarão branco do Pacífico

Dentre as espécies de camarão de interesse comercial, destacam-se os peneídeos, especialmente os dos gêneros *Penaeus* e *Litopenaeus*, os quais, apesar de serem considerados camarões marinhos, adaptam-se também à água salobra. Dentre os camarões de água doce, podemos citar o gênero *Macrobrachium*, porém de menor impacto comercial.

Endêmico da costa oriental do Oceano Pacífico, o peneídeo *Litopenaeus vannamei* ocorre desde a região de Tumbes, no Peru, até a região de Sonora, no México (Figura 1), sendo conhecido como camarão branco do Pacífico, ou camarão de patas brancas. A espécie *L. vannamei*, assim como as demais espécies de peneídeos, são consideradas pantropicais, ou seja, sua distribuição geográfica estende-se por toda a região tropical, em ambos os hemisférios (Noga; Hancock; Bullis, 2006). A Figura 2 mostra um espécime adulto de *L. vannamei* em um aquário de água clara.

Figura 1: Mapa indicando a origem e área de distribuição geográfica do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*.



Fonte: FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/species/3404/en>

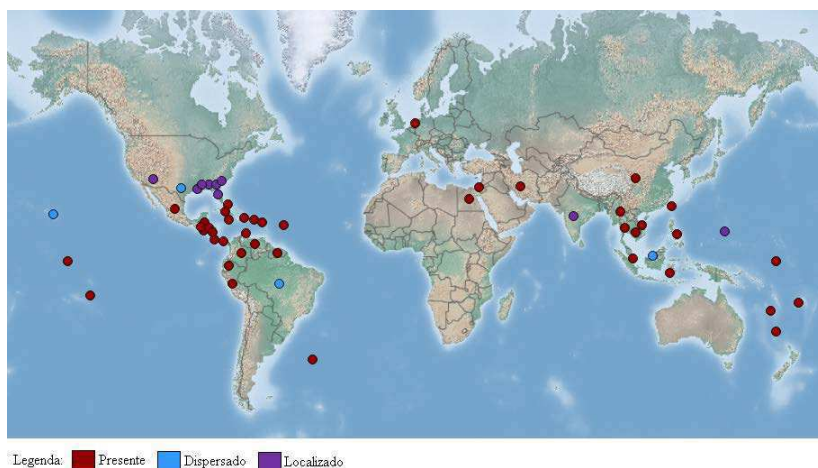
Figura 2: Espécime adulto de *Litopenaeus vannamei* mantido em água clara.



Fonte: Foto gentilmente cedida por Kurt Servin, 2017.

Por ter sido introduzido antropogenicamente em toda a região tropical, mas ser originário de uma região delimitada, há uma discussão se esta espécie pode ser considerada invasora ou não. Contudo, segundo os critérios do CABI – *Invasive Species Compendium* 2007, o *L. vannamei* não representa ameaça à biodiversidade, pois parece não formar grandes populações reprodutoras e por gerar resultados econômicos positivos em áreas não indígenas. Há uma preocupação em termos ecológicos de que esta espécie seja carreadora de doenças infecciosas, em especial as virais, podendo resultar em consequências negativas sobre a sua própria cultura, sobre a cultura de espécies nativas e sobre populações selvagens de crustáceos. Contudo, não há relatos desta consequência. A Figura 3 mostra o novo mapa de distribuição de *L. vannamei* posteriormente ao seu espalhamento como espécie exótica.

Figura 3: Novo mapa de distribuição do *Litopenaeus vannamei*, após sua dispersão mundial.



Fonte: CABI – *Invasive Species Compendium*. Disponível em: www.cabi.org/isc/datasheet/71097

Os machos de *L. vannamei* podem alcançar um comprimento de 187 mm e as fêmeas 230 mm. A espécie possui características zootécnicas que lhe faz ser adequada à aquicultura, as quais são: pode ser estocada mesmo em tamanhos pequenos, alimenta-se de modo satisfatório mesmo em cativeiro; apresenta excelente conversão

alimentar, crescimento rápido e uniforme; possui baixo requerimento proteico quando comparado a outras espécies; é onívora; e adapta-se bem a diversas condições ambientais (Jory; Cabrera, 2012).

Com crescimento rápido, alcança até 20g, geralmente o tamanho máximo com o qual é comercializado. Embora possa ultrapassar esse peso em que geralmente é comercializado, podendo atingir até 24g, após esse tamanho de 20g seu crescimento passa a ser lento, particularmente no caso dos machos. O *L. vannamei* pode ser produzido em altas densidades, como 400 animais/m² em sistema controlado de recirculação, resultando em uma maior produtividade por unidade de área. Sobre o requerimento proteico, o *L. vannamei* é detritívoro e requer uma menor porcentagem de proteína na ração, 20-35% em comparação a outras espécies, como *Penaeus monodon* e *Penaeus stylirostris*, os quais requerem 36-42%. Como consequência, a produção de *L. vannamei* resulta em um menor custo operacional e na facilidade de adaptação a sistemas heterotróficos fechados (FAO, 2005).

Como exemplo de adaptação, New e Kutt (2010) ressaltam que o *L. vannamei* também pode ser descrito como camarão de água doce, pois quase 50% de sua produção na China ocorrem em baixíssimas salinidades. Isso acontece não só devido ao aceite pelo mercado consumidor, mas também porque o *L. vannamei*, em condições de clima temperado, apresenta maior período de crescimento e maior potencial de produção por hectare comparativamente ao *Macrobrachium rosenbergii*. Nas Filipinas, o mercado consumidor divide-se em dois: pessoas que moram na costa preferem alimentar-se com o camarão de água salgada, enquanto as que residem longe das áreas costeiras preferem camarão de água doce; deste modo, a produção de *L. vannamei* adaptou-se ao mercado. Já no México, *L. vannamei* mantidos em água doce podem valer no mínimo 10% a mais do que os animais criados em água salgada. A diferença deve-se ao fato do camarão, quando na água doce, apresentar uma coloração corporal mais escura e, após o cozimento, mais vermelha, aumentando seu valor de mercado (Servin, 2017).

A rusticidade do *L. vannamei* e relatos de seu cultivo em águas com diferentes graus de salinidade colocaram esta espécie marinha como um novo potencial para regiões distantes da costa também no Brasil, uma vez que a possibilidade de seu cultivo em águas continentais tem atraído recentemente a atenção de piscicultores (Malamud, 2017).

Esta espécie de camarão marinho pode ser considerada como o pilar da carcinicultura em nível mundial. Seu destaque nos cultivos pode ser atribuído ao conjunto de suas qualidades zootécnicas, como

mencionado acima, aliado ao conhecimento acumulado relativo à sua reprodução e larvicultura.

4. Sistema de bioflocos

A carcinicultura brasileira baseia-se principalmente no sistema tradicional autotrófico. Estes sistemas tradicionais de produção de camarão caracterizam-se por ocupar grandes áreas territoriais, quase que exclusivamente em regiões costeiras. Esses têm sido questionados por questões socioambientais, como disseminação de doenças associadas à produção, introdução de espécies exóticas e, ainda, geração de efluentes com alta concentração de nutrientes e matéria orgânica (Primavera, 2006).

Em contrapartida, o cultivo com ausência de renovação de água “ZEAH” (*Zero Exchange, Aerobic, Heterotrophic Culture System*) ou o cultivo em meio com bioflocos (BFT – *Biofloc Technology System*) surge como uma opção aos sistemas convencionais de produção, minimizando o impacto ambiental e resultando em uma carcinicultura ambientalmente correta, pois a produção é realizada praticamente sem renovação de água, com aproveitamento dos agregados microbianos como alimento natural e com mais biosegurança, visto que há menor possibilidade de introdução de patógenos no sistema (Waselesky et al., 2006), além da redução da salinização dos corpos de água (Boyd, 2003) e o controle da qualidade da mesma. A Tabela 1 compara quatro diferentes sistemas de produção.

Entende-se por bioflocos os agregados de micro-organismos (bactérias, fitoplâncton e zooplâncton) associados a partículas, colóides, polímeros orgânicos e células mortas (Forster, 1976; Ahmad et al., 2017). Seu uso está baseado na manipulação de micro-organismos em um sistema com zero ou baixa troca de água, em tanques com aeração constante (Avnimelech, 2014). Ju e colaboradores (2008) descreveram a composição de flocos microbianos secos, advindos da produção de *L.vannamei*; a maior parte de sua composição é de cinzas e detritos (resíduo alimentar, fezes), seguidos de fitoplâncton; biomassa bacteriana, sendo dois terços compostos por bactérias Gram positivas e um terço por bactérias Gram negativas, representando um pequeno percentual na composição; e, finalmente, uma pequena parcela de zooplâncton (Figura 4). A formação e a estabilidade do bioflocos dependem essencialmente do suprimento de oxigênio e do fornecimento de matéria orgânica (Avnimelech, 2014), sendo que outros fatores

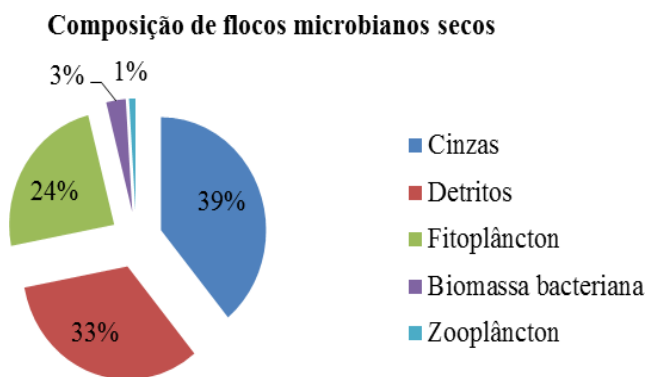
também influenciam na sua conformação, tais como pH e temperatura (De Schryver et al., 2008).

Tabela 1: Comparação entre quatro diferentes sistemas de carcinicultura, baseada em densidade, produção e parâmetros operacionais.

Parâmetros	SISTEMAS DE PRODUÇÃO			
	Extensivo	Semi-intensivo	Intensivo	Altamente intensivo
Aeração mecânica	Ausente Mínima troca de água	Sim; Troca de água	sim	sim
Alimentação	Natural	Natural e Formulada	Natural e Formulada	Natural e Formulada
Área do tanque (ha)	5 a 100	1 a 25	0,1 a 5	0,1 a 1
Ciclos de produção (dias)	100 a 210	100 a 210	80 a 140	80 a 120
Densidade (PL/m ²)	1 a 5	5 a 25	26 a 120	120 a 500
Exigência de gestão	Mínima	Moderada	Alta	Muito alta
Fertilização	Não	Geralmente sim	Algumas vezes	Algumas vezes
Níveis de aeração (cv/ha)	0 a 2	2 a 5	6 a 20	20 a 60
Procedência das sementes	Selvagem	Maior parte de laboratório	Laboratório	Laboratório
Produção anual (kg/ha)	50 a 500	500 a 5.000	5.000 a 20.000	20.000 a 40.000
Troca de água (diária)	5% maré	5 a 10% bombeamento	Acima de 25% bombeamento	Acima de 25% ou renovação (BFT) bombeamento

Fonte: Jory e, Cabrera (2012). PL: pós larva; ha: hectare; cv: cavalos de força; BFT: tecnologia de bioflocos.

Figura 4: Composição de flocos microbianos secos.



Fonte: Adaptado de Ju et al. (2008)

Os micro-organismos presentes no bioflocos auxiliam na assimilação dos compostos nitrogenados presentes na água de cultivo, possibilitando que a mesma seja reutilizada por diversos ciclos (Thompson et al., 2002). Assim, inicialmente, uma comunidade autotrófica, com a adaptação dos micro-organismos, torna-se mixotrófica (bioflocos verde) e, posteriormente, torna-se heterotrófica e aeróbica, após a maturação do sistema de bioflocos. A comunidade heterotrófica utiliza moléculas orgânicas para obter energia, logo a matéria orgânica é necessária para a sua formação (Avnimelech, 2014). São as bactérias heterotróficas que atuam na formação dos flocos microbianos, aproveitando o nitrogênio inorgânico da água e o carbono dissolvido para produção da biomassa de bactéria, mantendo a qualidade da água no nível satisfatório. O estabelecimento dos agregados microbianos é realizado por meio da manipulação da relação de carbono:nitrogênio (C:N) do cultivo, sendo essa relação mantida entre 15 e 20:1, ou no mínimo acima de 10:1, além da forte e constante aeração da coluna de água. Se esta relação C:N estiver bem equilibrada, como por meio de fontes adicionais de carbono (como, glicose, sacarose, melão, trigo, milho, mandioca ou sorgo) (Ahmand et al., 2017), os componentes inorgânicos do nitrogênio (amônia, nitrato e

nitrito) são convertidos em biomassa bacteriana (Avnimelech, 2009). A imobilização do nitrogênio inorgânico tem início quando a relação C:N está superior a dez (Ahmad et al., 2017).

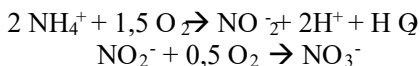
Desta maneira, os nutrientes advindos da produção e dos alimentos podem ser reciclados na forma de biomassa bacteriana; possibilitando que os bioflocos assim formados possam ser consumidos como alimento complementar pelos animais no tanque (Avnimelech, 2006). Ademais, a comunidade bacteriana que se estabelece no sistema com bioflocos pode inibir a proliferação de potenciais micro-organismos patogênicos, por meio de competição por alimento e ambiente (Crab et al., 2010). Alguns compostos bioativos, tais como ácidos orgânicos, como acetato e butirato, por exemplo, podem inibir o crescimento de patógenos, agindo como probióticos naturais e imunoestimulantes. Alguns autores consideram o bioflocos como um manejo com impacto probiótico natural e biotecnológico (Ahmad et al., 2017).

De fato, a comunidade microbiana presente na água do viveiro desempenha um importante papel na disponibilidade de alimentos naturais, na taxa de reciclagem dos minerais e na dinâmica do oxigênio dissolvido no viveiro de camarão. Se, por um lado, o manejo da comunidade microbiana pode ajudar a prevenir ou reduzir o risco de doenças; contudo, por outro, se mal manejada, o desequilíbrio desta comunidade pode acarretar em condições que facilitem o crescimento de bactérias patogênicas (Jory; Cabrera, 2012), além de ser danoso para os animais.

Zhao e colab (2012), em um experimento com *M. japonicus* produzidos em bioflocos, descreveram que, quando o sistema é suplementado com sacarose e probiótico, ocorre predominância de *Bacillus* sp, do filo Firmicutes. Contudo, quando somente há suplementação de probióticos, sem adição de sacarose, *Vibrio* spp, do filo Proteobacteria, passam a ser dominantes. Segundo os autores, este resultado indica a durabilidade de *Bacillus* sp e a inibição de *Vibrio* sp em um sistema de bioflocos equilibrado. Ainda nesse relato, outras bactérias encontradas, porém em muito menor quantidade, foram *Roseobacter* sp e *Cytophaga* sp.

Bactérias nitrificantes e desnitrificantes desempenham papel importante na manutenção do biofocos mixotrófico, e de uma qualidade da água satisfatória na produção. O nitrogênio está presente na água em diversas formas: nitrogênio molecular (N_2), amônia não ionizada (NH_3), íon amônio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e nitrogênio orgânico. Altas concentrações de nitrito ocorrem quando o processo de nitrificação cessa antes do nitrito ser oxidado a nitrato, ou devido

bactérias desnitrificantes produzirem nitrito ao invés de gás nitrogênio (Boyd, 2012). O nitrogênio presente na amônia é oxidado a nitrato pelas bactérias nitrificantes em duas etapas:



Em zonas de anaerobiose, bactérias desnitrificantes reduzem o nitrato a nitrogênio molecular, utilizando metanol como fonte de carbono:



A amônia também se difunde para a atmosfera a partir da água, especialmente quando o pH está em 8,0 ou acima deste valor.

A tolerância à presença de amônia na água varia de acordo com a espécie animal, condições fisiológicas e fatores ambientais. No caso de crustáceos, assim como para peixes de águas quentes, a concentração letal de amônia não ionizada é de 0,4 – 2,0 mg/L para uma exposição entre 24 e 96 horas. Ainda pouco se conhece sobre a reação entre a hemocianina (proteína transportadora de oxigênio, similar funcionalmente à hemoglobina, porém apresentando cobre ao invés de ferro em sua composição) em crustáceos e o nitrito, mas sabe-se que este também é tóxico para crustáceos (Boyd, 2012). Já o nitrato somente é tóxico se presente em altas concentrações.

Deveras, considera-se que uma das principais contribuições das bactérias heterotróficas é a decomposição e a mineralização do nitrogênio orgânico dissolvido e particulado. Essas bactérias podem usar NH_4^+ e NO_3^- para crescimento e síntese de biomassa, sendo consideradas importantes consumidoras de nitrogênio orgânico em ambientes aquáticos. O nitrogênio adentra as bactérias heterotróficas por difusão na parede celular, e, utilizando o carbono como fonte de energia necessitam, portanto, de nitrogênio para formação de biomassa. Destacam-se as bactérias da classe *Gammaproteobacteria*, com ênfase nos gêneros *Vibrio* e *Pseudoalteromonas*, os quais expressam o gene *nasA*, associado à assimilação de nitrato no ambiente marinho (Urakawa, Rivera 2006). Evidenciam-se também os gêneros quimioautotróficos *Nitrosomonas*, proteobactéria nitrificante, a qual oxida amônia a nitrito; e *Nitrobacter*, a qual oxida nitrito a nitrato. Salientam-se também *Nitrosococcus*, *Nitrosospira* e *Nitrospira*. Em

sistemas marinhos de recirculação, este último gênero geralmente é o primeiro a predominar.

Importante salientar que, durante o processo de nitrificação, ocorre a produção de oxigênio assim como o consumo de gás carbônico e geração de acidez (íons H^+). A fim de que o pH seja mantido dentro dos parâmetros aceitáveis e, conseqüentemente, mantenha-se a alcalinidade da água, é recomendável a adição de cal hidratada, ou calcário na água do tanque, mantendo-se o pH entre 7.0 e 9.0 e a alcalinidade mínima de 100 mg/L de $CaCO_3$. Níveis abaixo desses limites afetam as enzimas de nitrificação nas bactérias nitrificantes.

O grande benefício do bioflocos é que a imobilização das formas tóxicas do nitrogênio ocorre muito mais rapidamente neste sistema, pois a taxa de crescimento e a produção de biomassa bacteriana por bactérias nitrificantes heterotróficas são dez vezes maiores em comparação a bactérias nitrificantes, porém autotróficas (Ahmad et al., 2017). Ademais, muitos produtores têm optado pelo bioflocos como alternativa de sistema superintensivo, pois devido à troca zero, ou quase zero de água, esta se apresenta como alternativa econômica, com maior biossegurança e de menor impacto ambiental. Por ter função complementar na alimentação, como alimento natural *in situ*, animais produzidos com bioflocos apresentam menor taxa de conversão alimentar; por fim, pela potencial ação como imunostimulante, auxilia na prevenção contra doenças. Digno de nota é que o BFT é um sistema essencialmente de alta densidade. Em um sistema de larga escala (*Belize Aquaculture*), foi observado que, em estocagem abaixo de 100 pós-larvas/m² de *L.vannamei*, o estabelecimento da comunidade heterotrófica era muito mais difícil devido à baixa quantidade de substrato orgânico disponível para o crescimento microbiano. Em animais adultos, altas densidades estão sendo testadas: no mínimo 300 camarões/m³, sendo já idealizado seu emprego com 600 a 800 camarões/m³ (Avnimelech, 2014).

Apesar de muitos aspectos positivos, o sistema de bioflocos apresenta algumas limitações. Comparado aos sistemas tradicionais, os custos com a tecnologia de bioflocos são mais elevados, porém a atividade é viável economicamente, pois o retorno do investimento é bastante atrativo (Poersch et al., 2012). Para algumas espécies, como a tilápia, o excesso de turbidez deve ser controlado com atenção; enquanto que para camarões é vantajoso, pois desfavorece o crescimento de algas (Avnimelech, 2014). Deve-se ter especial atenção aos parâmetros de qualidade de água, tais como sólidos totais, oxigênio dissolvido e temperatura. Os sólidos são removidos em grande quantidade, o que

muitas vezes pode ser um revés ambiental. Além disso, requer profissionais qualificados com entendimento pleno do sistema. Este último ponto tem sido, atualmente, apontado entre os entraves e desafios para a carcinicultura nacional (Aquaculture Brasil, 2017).

Como exemplo de aplicabilidade bem-sucedida do sistema com bioflocos, podemos citar o norte do Peru e todo o Equador, onde atualmente toda a carcinicultura é baseada neste sistema. Ademais, mencionamos o sistema AquaScience® Technology, da empresa brasileira Camanor Produtos Marinhos. O AquaScience® é um sistema integrado, com produção de *L. vannamei* associado à produção de tilápia, com atenção ao bem-estar animal e à produção ecologicamente adequada. A produção apresenta alta densidade de estocagem, assim como troca zero de água, a qual é tratada e reutilizada, não ocorrendo, portanto, descarte de efluentes. Como no BFT, a água de produção tem predominância de bactérias heterotróficas, contudo há também abundância de microalgas. O sistema tem sido apresentado como revolucionário, equilibrado e, até então, biosseguro.

5. Síndrome da Mancha Branca

Em relação à sanidade animal, as condições de cativeiro e, por conseguinte, a intensificação da produção, por muitas vezes não conseguem abarcar todos os aspectos ecológicos e fisiológicos dos animais cultivados (Bachère, 2000), tendo muitas vezes como consequência a degradação ambiental e o surgimento de patologias nos cultivos (Borghetti; Ostrensky; Borguetti, 2003).

Estima-se que as doenças já tenham causado um prejuízo de US\$ 3 bilhões para a carcinicultura, tendo sido recomendado um investimento em pesquisa preventiva de US\$ 275 milhões para os próximos 15 anos (Lakshmi; Viswanath; Gopal, 2013). Apesar dos camarões serem suscetíveis a diversos patógenos, tais como fungos, bactérias e vírus, as infecções virais são ainda consideradas as mais devastadoras, levando a elevadas perdas econômicas neste setor produtivo (Lightner et al., 2012).

A Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Disease – WSD*¹) é uma das mais devastadoras enfermidades de etiologia viral de camarões

¹ A enfermidade *Bacterial White Spot Syndrome* (BWSS) também pode ocasionar o surgimento de manchas brancas em penaeídeos, porém sem a presença do Vírus da Síndrome da Mancha Branca. Na Índia e na Malásia, a BWSS foi descrita em *Penaeus monodon*, associada ao *Bacillus subtilis* e a isolados de *Vibrio* sp, não

peneídeos, acarretando perdas elevadas na produção, com índices de mortalidade elevados (80% a 100%) e rápidos – 2 a 3 dias em juvenis e 7 a 10 dias para animais adultos, após os primeiros sinais clínicos da infecção, e, conseqüentemente, acarretando prejuízos econômicos significativos (Lightner et al., 2012). Estima-se que o impacto econômico em nível mundial gire em torno de US\$ 1 bilhão ao ano, desde 1994 (FAO, 2005). Outras denominações já foram usadas para descrever a mesma patologia: *White Spot Syndrome Baculovirus Complex* (WSBV), *Hepatopoietic Necrosis Baculovirus* (HHNBV), *Shrimp Explosive Epidermic Disease* (SEED) e *Penaeid Rod-sahped DNA virus* (PRDV) (FAO, 2005).

O primeiro caso de WSD foi descrito em 1991, na China (Steintiford; Bonari; Alday-Sanz, 2009). A doença rapidamente se espalhou por alguns países produtores da Ásia, tais como Taiwan (República da China) em 1992, seguido do Japão e Tailândia.

Em 1995, a WSD foi reportada nos Estados Unidos da América (FAO, 2005), tendo sido sua introdução rastreada a partir da entrada de camarões congelados e importados da Ásia (Nunan; Poulos; Lightner, 1998; Durand et al., 2011). Após novos registros em 1996 na Indonésia, Malásia e Siri-Lanka e, em 1997, no Vietnã, registrou-se sua presença na América do Sul, sendo em 1998 no Peru e, em 1999, no Equador e na América Central (Souza, 2008). Até recentemente, a Austrália era considerada livre da doença (OIE, 2013), apesar de o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (*White Spot Syndrome Virus - WSSV*) já ter sido anteriormente detectado na região norte do país, em iscas importadas de camarão (East et al., 2002); conquanto, em dezembro de 2016, a presença do WSSV foi confirmada no estado de Queensland, em uma fazenda de camarão localizada na região do rio *Long River* (Australian Government, Department of Agriculture and Water Resourcer, 2017).

No Brasil, os primeiros surtos da WSD foram observados ao final do ano 2004 em cultivos de Santa Catarina, tendo sido o diagnóstico realizado em janeiro de 2005 na Universidade do Arizona (UAZ) e na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (CIDASC,

sendo observada a presença do vírus (Wang et al., 2000; Selvin; Lipton, 2003). Já na Tailândia, produtores observaram o aparecimento de manchas brancas, porém associadas à alta alcalinidade no ambiente de cultivo, indicando, possivelmente, o envolvimento bacteriano como sendo secundário (FAO/NACA, 2001a). No presente trabalho, a sigla WSD (*White Spot Disease*) refere-se somente à doença associada à presença do *White Spot Syndrome Virus* (WSSV).

2006). O prejuízo econômico para a carcinicultura no estado foi de aproximadamente, R\$ 6 milhões (Seiffert et al., 2006). Acredita-se que estes surtos de WSD tenham iniciado com o movimento e/ou transporte transfronteiriço de camarões vivos e infectados, sejam de reprodutores ou de pós-larvas (FAO, 2001b). Presume-se que o WSSV esteja presente nos camarões de vida livre da Ásia e da América Latina (FAO, 2005).

O agente etiológico viral da WSD, o WSSV, é um vírus envelopado com material genético composto por DNA circular dupla fita, com aproximadamente 300 kb, do gênero *Whispovirus* e família *Nimaviridae* (Sánchez-Paz, 2010). A partícula viral possui tamanho aproximado de 80-120 x 250-380 nm. Variações no genoma do WSSV foram detectadas em diferentes isolados geográficos, inclusive do Brasil (Müller et al., 2010). Em alguns casos, essas diferenças foram relacionadas à virulência, como no caso de isolados com genomas menores tendendo a apresentar maior grau de virulência (Shekar et al., 2012).

Como relevante sinal clínico, mas não patognomônico, a WSD pode acarretar o surgimento de manchas brancas arredondadas, entre 0,5 e 3,0 mm de diâmetro, resultantes do acúmulo de sais de cálcio na epiderme cuticular dos camarões (Wang et al., 1999). Apesar de comumente associada ao WSSV, nem sempre há a presença das manchas brancas em camarões infectados pelo vírus.

Outros sinais clínicos incluem inapetência, letargia, redução no consumo de alimentos, perda da cutícula, descoloração do hepatopâncreas e retardo na coagulação da hemolinfa (Verbruggen et al., 2016). A susceptibilidade foi registrada desde ovos até indivíduos adultos reprodutores, mas ainda não se sabe ao certo se ovos infectados conseguem desenvolver-se (Cuéllar-Anjel et al., 2014). Em muitos casos, animais moribundos podem apresentar coloração corpórea entre rosa a avermelhado, devido à expansão dos cromatóforos cuticulares (Brady, 2000), não sendo esta, entretanto, uma observação exclusiva da infecção pelo WSSV. A Figura 5 apresenta dois indivíduos juvenis da espécie *L. vannamei* infectados com o WSSV.

Figura 5: Espécimes de *Litopenaeus vannamei*. Em A: animais não infectados mantidos em água clara. Em B: animal infectado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), mantido em água clara.

A: Animais não infectados (12,0g).



Fonte: Foto gentilmente cedida por Kurt Servin, 2017.

B: Animal infectado com o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV) (10,0g).



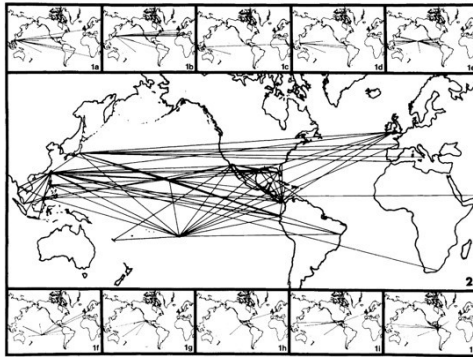
Fonte: Cecília de Souza Valente & Karla de Oliveira Ortiz, 2016.

O WSSV não infecta apenas o camarão *L. vannamei*, apresentando, na realidade, uma gama relativamente ampla de hospedeiros. Interessantemente, alguns animais desenvolvem a doença clínica, enquanto outros são somente portadores assintomáticos; estes, atuando como vetores, aumentam o risco da transmissão horizontal e via

commodity. Algumas espécies de caranguejos marinhos sem sinais clínicos visíveis já foram diagnosticadas como portadoras do WSSV, assim como o vírus já foi detectado em camarões marinhos selvagens assintomáticos (Hossain et al., 2001; Marques et al., 2011; Costa et al., 2012). No camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergii*, o WSSV parece induzir à doença clínica somente em pós-larva e juvenis, sendo que animais adultos são mais tolerantes à infecção viral (Prmod.Kiran et al., 2002). Entre as espécies de camarão que são sabidamente suscetíveis à infecção, apresentando altas mortalidades, podemos enumerar dentre os de água doce *Macrobrachium idella* e *Macrobrachium lamerrae*; de água salgada, além do *L. vannamei*, *Penaeus indicus*, *Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*, *Penaeus penicillatus*, *Penaeus setiferus* e *Penaeus stylirostris* (Hameed; Charles; Anilkumar, 2000; FAO, 2005). Como exemplo de espécies de caranguejo que são suscetíveis e apresentam alta mortalidade, podemos citar: *Paratelphusa hydrodomous* e *Paratelphusa pulvinata* (Hameed et al., 2001). Além destas, o vírus já foi identificado em lagostas, lagostins e copépodes (Clark et al., 2013; Mendoza-Cano et al., 2014; Pace et al., 2016).

As vias de transmissão horizontal do WSSV são por meio do consumo de tecidos infectados, por canibalismo ou predação, e por água contaminada com virion. Considera-se que o canibalismo seja a principal via de transmissão, visto que as espécies mais predadoras (*P. monodon*, *M. japonicus*) são as que mais apresentam a doença na sua forma aguda e maior mortalidade (Owens, 2011). Apesar de ser considerada a transmissão vertical, ainda é incerto se ocorre de fato (Tuyen et al., 2014; Raja et al., 2015); o que se sabe é que o vírus pode ser encontrado em células ao redor dos ovos no ovário, mas raramente nos ovos em si (Kasornchandra et al., 2002). Segundo um modelo epidemiológico matemático proposto por Soto e Lotz (2001), o WSSV é mais facilmente transmitido por meio da ingestão de tecidos infectados do que pela coabitação com outros hospedeiros infectados. Como mencionado acima, acredita-se que o vírus possa ser transportado via *commodity* congelada, conforme reiterado por Durand e colaboradores (2000) ao relatarem a presença do WSSV em camarões congelados e importados, disponíveis nos Estados Unidos. Lightner (1990) evidenciou a existência do "vetor *jumbo jet*", em outras palavras, a movimentação de crustáceos vivos ao redor do globo (Figura 6).

Figura 6: Transporte de camarões vivos entre fronteiras.



Figuras menores representam transporte de camarões vivos de ou para locais específicos, a saber: 1a: Taiwan; 1b: Japão; 1c: Malásia; 1d: Filipinas; 1e: Havaí; 1f: Taiti; 1g: Puerto Penasco, México; 1h: Texas, EUA; 1i: Florida, EUA; 1j: Panamá. Figura maior representa a combinação das figuras menores. Fonte: Lightner, 1990.

No organismo, o vírus replica-se em tecidos de origem mesodérmica e ectodérmica, como brânquias, órgão linfoide, epitélio cuticular, tecidos conectivos, nervos, músculos e tecidos hematopoiéticos (FAO, 2005; Cuéllar-Anjel et al., 2014). O vírus também pode causar lesões no estômago, glândulas antenais, coração e olhos. Nos estágios avançados da infecção, os órgãos são destruídos e muitas células sofrem lise (FAO, 2005). Células epiteliais que compõem órgãos de origem endodérmica, tais como hepatopâncreas e intestino médio, são refratárias à infecção pelo WSSV (Hameed et al., 1998). Algumas condições podem favorecer a replicação viral e, conseqüentemente, a propagação da doença: ablação, desova e temperaturas entre 15 e 30 a 32 C (Moser et al., 2012; Cuéllar-Anjel et al., 2014).

Tal como nas infecções virais clássicas, a infecção pelo WSSV é dividida em três momentos: a entrada na célula hospedeira, por endocitose, a replicação do genoma viral, e a montagem e liberação das novas partículas virais. A ativação do processo de endocitose dá-se pela interação proteica entre o vírus e a célula do hospedeiro, sendo a maior proteína do envelope viral, a VP28, aquela de maior importância neste processo. Uma vez no interior celular, o vírus dirige-se até o núcleo, onde fatores de transcrição do hospedeiro, ligados a promotores virais,

ativam a transcrição. Estes primeiros genes transcritos são denominados de genes precoces imediatos, os quais codificam fatores de transcrição e outros reguladores que permitirão a transcrição dos demais genes virais. Os chamados genes tardios são expressos após o início da síntese do DNA viral e incluem proteínas estruturais, fundamentais para a formação de novas partículas virais (Verbruggen et al., 2016). Ao final da infecção, ocorre a fragmentação destrutiva do núcleo celular e posterior desintegração da célula, levando à formação de necrose e vacuolização (Escobedo-Bonilla et al., 2008).

Buscando prevenir a infecção, ou minimizar seu impacto, algumas estratégias têm sido sugeridas, como aquelas baseadas no sistema imune do hospedeiro, por meio da ativação do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), tais como lipopolissacarídeos e peptidoglicanos, emprego de RNA de interferência (RNAi), *vacinação*, e fitoterapia. Tradicionalmente, o termo *vacinação* refere-se à “imunização ativa pela administração de preparações de antígenos” (Flores, 2007, p.887). O sistema imune dos camarões, assim como dos demais invertebrados, envolve somente o sistema de defesa inato, ou seja, os camarões possuem somente a imunidade natural ou não específica, a qual compreende componentes celulares e componentes humorais, não apresentando, portanto, diferentemente dos vertebrados, um sistema imune compreendendo tanto respostas inatas quanto adaptativas (memória imunológica e produção de anticorpos específicos). Assim sendo, o emprego deste termo aplicado a crustáceos pode ser considerado pouco claro conceitualmente e suscitar controvérsias.

Contudo, se pensarmos no propósito de induzir a uma resposta de defesa no hospedeiro, é possível aplicar o conceito de imunoestimulação a invertebrados. Apesar de curta duração (somente 14 dias), recentemente, Musthaq e Kwang (2015) demonstraram que é possível conferir proteção temporária contra o WSSV a partir da exposição a partículas virais inativadas, proteínas recombinantes do envelope viral, DNA viral e RNA de fita dupla. Em um estudo semelhante, Rout e colab. (2007) constataram que a imunoestimulação com fragmentos de DNA que codificam para uma proteína do envelope viral conferiu proteção contra o WSSV, em *P. monodon*. Nesta mesma espécie, Witteveldt e colab. (2004) observaram a diminuição da mortalidade em viveiro, após imunoestimulação oral contra WSSV, por meio da administração de bactérias inativadas as quais expressavam proteínas do envelope viral. Por fim, Ghosh e colab. (2014) obtiveram

86% de sobrevivência em *L. vannamei* infectados com WSSV, após administração, via oral, de drogas a base de plantas terrestres, como a *Momordia charantia*, conhecida popularmente por “melãozinho” ou “melão de São Caetano”.

Como forma de prevenção, produtores e governos devem caminhar juntos, com um plano preventivo, o qual deve incluir regular monitoramento da produção, procedimentos e ações a serem tomadas em caso de surto potencial ou real, além de certificação das pós-larvas e dos reprodutores. Sugere-se também que uma das principais soluções para o combate a doenças infecciosas em camarões seja a produção de animais domesticados no próprio território, e sabidamente livres de patógenos específicos, alimentados com ração seca nutritiva, em tanques biosseguros e em ambiente não estressante (FAO, 2001b; 2005). Em relação à água do cultivo, o WSSV permanece infectante neste meio somente por três a quatro dias, sendo a sua desinfecção uma ferramenta efetiva. Recomenda-se o uso de 70 ppm de formalina ou 30 ppm de cloro ativo (46g de hipoclorito de sódio a 65% por m³) na água. Todo efluente com a possibilidade de contaminação viral deve ser desinfetado ou com formalina, ou com cloro, antes de ser descartado (FAO, 2005). Todavia, a presença da doença e/ou do agente infeccioso não necessariamente inviabiliza a produção. Portanto, o conhecimento da patogenia e da epidemiologia da infecção é de grande valia para uma carcinicultura que seja viável para o produtor, segura para o consumidor e sustentável para o meio ambiente.

6. Respostas de defesa e transcrição gênica frente à infecção viral

Uma das principais formas de melhor compreender a patogenia de doenças infecciosas é o entendimento das respostas moleculares frente a infecções. Leelatanawit e colab. (2009), por exemplo, construíram uma biblioteca de cDNA a partir de testículos de *P. monodon* e apontaram que 3,3% dos genes expressos neste tecido podem ser classificados como genes de defesa e de homeostase. É possível afirmar que a identificação e o estudo de genes funcionalmente importantes e que estejam envolvidos com respostas de defesa, estresse e sistema imune permitirão melhor discernimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos na relação patógeno-hospedeiro. Como resultado, a aplicação destes conhecimentos promoverá uma carcinicultura sustentável e com tecnologia mais completa e bem fundamentada.

Bem definido por Alberts e colab. 2017, p.228:

A expressão gênica refere-se ao processo pelo qual a informação codificada na sequência de DNA é traduzida em um produto que desencadeia um efeito determinado em uma célula ou organismo... quando o produto final do gene é uma proteína, a expressão gênica inclui a transcrição e a tradução; quando uma molécula de RNA é o produto final do gene, a expressão gênica não requer a tradução.

Entende-se por patogenicidade aplicada às infecções virais “o conjunto de mecanismos pelos quais os vírus produzem doença em seus hospedeiros” (Flores, 2007, p.191), sendo que os principais sintomas clínicos observados no hospedeiro decorrem da resposta do mesmo a lesões celulares e teciduais. De modo complementar, a resposta do hospedeiro frente à infecção viral pode resultar, direta ou indiretamente, da replicação viral. Logo, a expressão diferencial de genes em um quadro infeccioso de origem viral pode ser entendida como uma resposta molecular de defesa ou como consequência, direta ou indireta, da influência do vírus na célula do hospedeiro influenciando, consequentemente, o estado de saúde do mesmo.

Alguns órgãos e tecidos estão envolvidos na defesa contra agentes invasores em camarões. Inicialmente, o exoesqueleto confere uma barreira física contra invasores. Na hemolinfa circulante, a fração celular, composta pelos hemócitos, representa a frente de combate aos organismos invasores, juntamente com fatores humorais nela dissolvidos. Essas células imunocompetentes, hemócitos, são as responsáveis por reações de defesa, como: fagocitose, formação de nódulos e cápsulas e produção de moléculas citotóxicas e microbidas – PAM ou peptídeos/proteínas antimicrobianas (Barracco, 2004). O hepatopâncreas, a glândula do intestino médio, além de ser responsável por funções relacionadas ao metabolismo e à digestão, também tem função coadjuvante na defesa, pois produz e secreta moléculas imunofetoras (Gross et al., 2001).

Diversos são os mecanismos de evasão imunológica que permitem ao WSSV interagir e/ou manipular o organismo do hospedeiro, a fim de manter o ambiente celular favorável à produção e liberação de novos virions. Da mesma forma, o hospedeiro tem diferentes formas de combater a infecção viral, desde respostas diretamente ligadas ao sistema imune, passando pela microbiota intestinal, até as respostas bioquímicas de defesa.

Os vírus e algumas de suas proteínas podem interferir com os mecanismos celulares do hospedeiro, como por exemplo, em termos de modificação, localização e maturação de proteínas, resultando em citopatologia (Flores, 2007b). A ubiquitina, por exemplo, é uma proteína reguladora encontrada em células de eucariotos, relacionada à via ubiquitina-proteossoma, e que possui importante função na regulação e reciclagem de outras proteínas. Este processo, denominado ubiquitinação, envolve a ligação da ubiquitina a proteínas, sinalizando-as para que sejam, muitas vezes, degradadas pelos mecanismos celulares, ou então mudadas de lugar no interior da célula (Chu et al., 2009). De modo muito perspicaz, o WSSV modula o mecanismo de ubiquitinação do hospedeiro, redirecionando as proteínas imunes do hospedeiro para o proteossomo 26S (complexo enzimático proteolítico), a fim de que ocorra a progressão da doença (Vidya; Gireesh-Babu; Prasad, 2013).

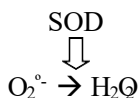
Uma das respostas de defesa de grande importância é a apoptose, visto que o processo de morte celular programada elimina células infectadas com patógenos intracelulares, tais como os vírus, além de destruir células cancerígenas (Smith et al., 2014). De fato, alguns vírus são capazes de desencadear a cascata de reações que leva à apoptose, sendo que outros tem a capacidade de inibir ou retardá-la, a fim de que a replicação viral seja concluída (Flores, 2007b). Durante a infecção pelo WSSV, o vírus desencadeia a cascata apoptótica, sendo esta uma das causas de morte em camarões infectados (Flegel, 2007). Alguns genes codificam para proteínas, tais como a proteína QM, que atuam como reguladores intracelulares de apoptose. Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram maior número de transcritos do gene codificante da QM em camarões *L.vannamei* infectados pelo WSSV (Müller, 2009).

Em um estudo comparativo sobre a eficiência das respostas antivirais do *Marsupenaeus japonicus*, Wang e Zang (2008) demonstraram que as respostas em forma de apoptose e fagocitose têm maior importância em termos de defesa contra agentes virais do que o sistema pró-fenoxidase (proPO), outra linha de defesa contra agentes invasores. A proteína QM também está relacionada ao processo de profenoxidização, regulando a atividade da enzima fenoxidase.

O sistema proPO faz parte da síntese bioquímica de melanina, uma importante resposta do hospedeiro a injúrias, muitas vezes complementar à formação de nódulos e cápsulas. O sistema proPO é uma cascata proteolítica, cujo produto final é a melanina. Inicialmente, ocorre o reconhecimento de PAMPs (padrão molecular de patógeno),

desencadeando então uma cascata proteolítica, por ação da enzima fenoloxidase. Disto decorre a liberação de produtos altamente citotóxicos, os quais confinam, matam ou fagocitam os microorganismos patogênicos, resultando em melanização, cujo aspecto visual é o escurecimento da região onde a melanina é depositada (Barraco, 2004; Smith et al., 2014). Sutthangkul e colab. (2015) sugerem que o WSSV suprime o processo de melanização, visto que dois a três dias após a infecção viral, a atividade da fenoloxidase apresentou níveis muito mais baixos em comparação a camarões não infectados. Os mesmos autores sugerem que a supressão da melanização corresponderia a uma forma de evasão viral.

Uma das moléculas transitoriamente produzidas pelo sistema proPO são as espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO também são produzidas durante outras reações celulares, como na fagocitose. A fagocitose é um processo multifásico que consiste em reconhecimento do não-próprio, internalização e, ao final, degradação por meio de enzimas hidrolíticas, proteínas antimicrobianas e ERO. As ERO são altamente reativas. Além de associadas a ação antimicrobiana, podem levar a sérios danos celulares devendo, portanto, ser neutralizadas. A enzima SOD (Superóxido Dismutase) atua como um antioxidante enzimático que converte o ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme a seguinte reação:



Logo, o estudo de enzimas antioxidantes, tais como a SOD, assim como de sua respectiva transcrição gênica, mostra-se interessante para a compreensão não somente do sistema imune, mas também como forma de avaliar o nível de estresse, visto a SOD convir como imunoparâmetro neste sentido (Barraco, 2004; Smith et al., 2014).

A calreticulina é uma proteína multifuncional presente no núcleo celular, no citoplasma (em especial no lúmen do retículo endoplasmático), na membrana celular e na matriz extracelular. Tem como importante função a manutenção adequada dos níveis de cálcio no organismo de eucariotos, ligando-se ao mineral e tornando-o inativo. Assim como a ubiquitina, a calreticulina encaminha proteínas para serem destruídas, caso estejam mal formadas. Também encontra-se associada à adesão celular, apoptose, cicatrização de feridas, sinalização de células tumorais e atuação como chaperona (Mendlovic; Conconi

2010). A calreticulina está relacionada à infecção pelo WSSV, pois um dos clássicos sinais clínicos é a presença de manchas brancas, as quais são depósitos de cálcio na cutícula do camarão (Wang et al. 1999). Recentemente, Wang e colab. (2014) descreveram que uma lectina tipo C do estômago de *M. japonicus* tem sua expressão induzida pela infecção pelo WSSV. Esta lectina interage com a proteína viral VP28, facilitando assim a infecção viral, ou seja, especificamente, a lectina tipo C faz a ligação entre a proteína viral e o receptor celular de calreticulina, contribuindo para a entrada do vírus na célula do hospedeiro.

A interação entre vírus e célula infectada resulta em diversas alterações na fisiologia celular. As partículas e proteínas virais podem alterar a estrutura da membrana celular, além de levar à desorganização ou ruptura do citoesqueleto da célula infectada. Podem também interferir com os mecanismos de transcrição, processamento e transporte de RNA mensageiro. Todas essas modificações na célula hospedeira são estratégias virais que visam favorecer a manutenção da infecção (Flores, 2007b). A tubulina é uma proteína do citoesqueleto, compondo os microtúbulos celulares, além de estar associada à liberação de novas partículas virais (Henry; Gorvel; Méresse, 2006). A proteína SEC 61 está relacionada à translocação de proteínas no retículo endoplasmático, fazendo parte de um complexo de translocação formador de canais. De acordo com Müller, 2009, a modulação positiva dos genes que codificam para estas proteínas deve-se ao aumento das proteínas virais no interior das células, sendo que as novas partículas virais usufruem de toda a maquinaria celular.

Histonas são proteínas nucleares que, ao se ligarem ao DNA, promovem o seu empacotamento e compactação. Conhecem-se cinco classes de histonas: H1 ou H5; H2A; H2B; H3; e H4; além das histonas de procariotos do Reino Archaea. Sabe-se que as histonas estão relacionadas às armadilhas extracelulares, importantes principalmente para a defesa contra infecções bacterianas (Ng et al., 2015). Após o reconhecimento do patógeno por parte da célula, o DNA descondensa-se, rompendo o núcleo e a célula; as histonas, que são microbicidas, neutralizam as bactérias. Em camarões, as histonas H1, H2A e H4, purificadas de *P. monodon*, mostraram ação microbiana contra bactérias Gram-positivas; de forma interessante, os autores observaram sinergismo quando H2A e H4, associadas, tiveram sua ação microbicida aumentada (Patat et al., 2004). Em *Rimicaris exoculata*, um camarão de águas termais e profundas do Oceano Atlântico, a transcrição de H1 foi negativamente modulada frente a um intenso estresse térmico (Cottin et

al., 2010). Entretanto, a possível atividade antiviral das histonas ainda carece de estudos.

Por fim, podemos assinalar uma resposta específica contra vírus, envolvendo a proteína Ran, uma proteína nuclear com atividade antiviral, pertencente à superfamília GTPase. A proteína do tipo Ran-GTPase tem função no transporte núcleo-citoplasma e também tem papel importante durante e após a mitose (Melchior, 2001). Descrita em *M. japonicus* e em *L. vannamei*, sua transcrição diferencial está relacionada à fagocitose antiviral, no caso da infecção pelo WSSV, e também a uma coinfeção WSSV + *Vibrio anguillarum*. Os genes diferencialmente transcritos foram observados em tecidos como brânquia, hemolinfa e hepatopâncreas, sendo que a supressão deste gene pode ser associada à alta mortalidade (Han; Zhang, 2007; Zhao; Jiang; Zhang, 2011; Qiao et al., 2015).

Não menos importante para o estudo da transcrição gênica são os genes referência ou *housekeeping genes*. Os genes de referência interna ou genes endógenos-controle são aqueles genes cuja transcrição se dá em nível constante (basal) entre diferentes tecidos do organismo, em qualquer estágio de desenvolvimento, ou seja, não são afetados por qualquer fator, independentemente do tratamento, tal como em uma infecção viral. Esses genes são utilizados como genes controle para corrigir a transcrição do gene alvo, e avaliá-la comparativamente (Bustin, 2000). Como exemplo, podemos citar os genes mais comumente utilizados como *housekeeping*: RNA ribossômico 18S, GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), β -actina, EF-1 α (fator de alongação 1 α) e proteína ribossomal S6. Contudo, é possível que um gene descrito anteriormente como gene de referência em um dado estudo mostre variação no nível de sua transcrição em uma condição distinta do mesmo. A dificuldade é maior quando se buscam genes de referência para diferentes tecidos. No presente trabalho, por exemplo, entre os genes avaliados, o gene que codifica para o rRNA 18S de decápodes mostrou-se o mais estável para a normalização dos dados de transcrição de genes alvo para três diferentes tecidos ou células, a saber brânquias, hemócitos e hepatopâncreas.

7. Comunidade bacteriana do ambiente aquático

Ainda há muito a ser estudado a respeito da composição microbiana dos diversos habitats do planeta. Interessante notar que duas comunidades microbianas podem ser diferentes, mesmo quando compartilham uma condição ambiental muito semelhante, porém se

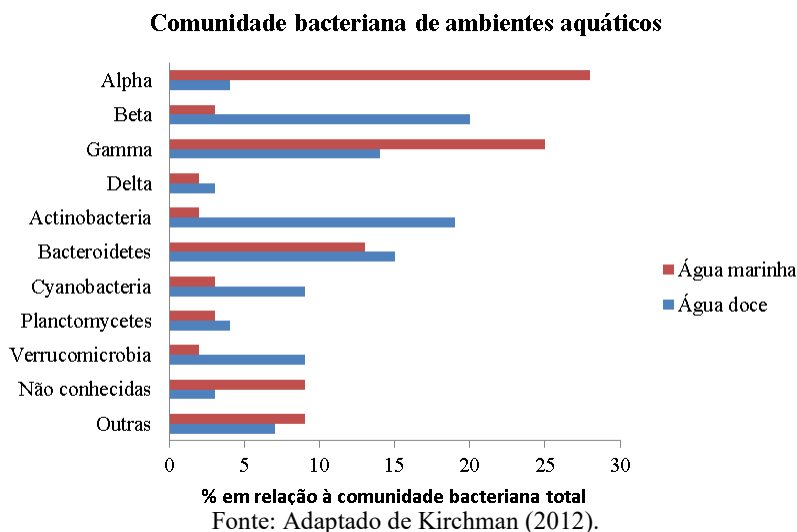
encontram em duas localidades separadas geograficamente. Conforme o botânico e microbiologista holandês Lourens Bass Becking, "tudo está em todo lugar, mas o ambiente o seleciona" (Wit; Bouvier, 2006).

O filo Proteobacteria é encontrado virtualmente em todos os habitats da biosfera, contudo, as classes diferem conforme o ecossistema. Em água doce, a classe mais dominante é a Betaproteobacteria, seguida pela Gammaproteobacteria e Alphaproteobacteria. No ambiente marinho, a classe mais abundante é a Alphaproteobacteria, especialmente a linhagem SAR11, seguida de Gammaproteobacteria e Betaproteobacteria, sendo esta última pouco abundante.

O segundo filo mais abundante no ambiente aquático é o Bacteroidetes. O gênero *Flavobacterium* é abundante nos oceanos, enquanto o *Sphingobacterium* é frequentemente encontrado em lagos e lagoas. O terceiro filo predominante é o Actinobacteria, abundante na água doce, principalmente as linhagens acI e acII, mas cuja presença é menor no ambiente marinho (Kirchman, 2012).

A Figura 7 ilustra a estrutura bacteriana já descrita nos ambientes marinho e de água doce.

Figura 7: Representação gráfica da comunidade bacteriana descrita em água marinha e em água doce. Alpha, Gamma e Delta referem-se às classes do filo Proteobacteria.



Deste modo, diferentes Filos e Subfilos de bactérias são encontrados em diferentes ambientes. Apesar de muitas bactérias diferirem em relação ao seu metabolismo, micro-organismos semelhantes filogeneticamente compartilham aspectos ecológicos.

Muitos são os fatores que interferem na estrutura da comunidade bacteriana do ambiente aquático. Estes podem ser físicos, tais como temperatura, pH, salinidade e equilíbrio osmótico, além de disponibilidade de oxigênio, luminosidade e pressão. Sabe-se que a temperatura tem grande influência na comunidade bacteriana dos oceanos. A diversidade é maior em águas tropicais, apesar de ocorrer uma brusca queda de diversidade se as águas marinhas estiverem acima de 65 °C. Ambientes com salinidades muito altas, assim como com pH muito ácido, também têm pequena diversidade bacteriana. Esta também é influenciada pela matéria orgânica disponível, em termos de quantidade e tipo (Kirchman, 2012).

De acordo com Cardona e colab. (2016), o Filo bacteriano mais frequentemente encontrado na água de cultivo de *L. vannamei*, tanto em produções com água clara quanto em bioflocos, é o Proteobacteria. Os autores apontam que, de todos dos filos bacterianos presentes na água clara, 50,4% são Proteobacteria, enquanto no sistema com bioflocos o percentual é 60%. Em seguida, os filos que se mostram mais abundantes são, em ordem: Bacteriodetes, Cyanobacteria, Euryarchaeota e Actinobacteria.

A importância em se conhecer a composição bacteriana do ambiente aquático, especialmente o marinho, está em este ser o principal ambiente de produção do *L.vannamei*, sendo que na aquicultura, a água é o ambiente comum a micro-organismos e animais de produção. As bactérias do ambiente aquático podem colonizar diversos tecidos do camarão, tais como brânquias e intestino. Apesar de nem todas as bactérias ingeridas colonizarem o trato intestinal, pode haver uma relação entre as microbiotas animal e marinha.

8. Microbioma intestinal, probióticos e identificação de micro-organismos

O estudo da fisiologia da digestão teve início por volta do ano 1780, quando Lazzaro Spallazani, estudioso padre italiano, desconfiou que ocorresse uma mudança na textura dos alimentos no estômago. No início do século XIX, pesquisadores começaram a estudar a função do suco gástrico, resultando na descrição da pepsina por Theodor Schwann, fisiologista alemão, em 1836. No século XX, pesquisadores

já reconheciam a importância de diversas enzimas no processo de digestão (Moyes; Schulte, 2008). No ano de 1907, o cientista russo Elie Metchnikoff deu início aos estudos sobre probióticos, associando o consumo de leite fermentado à longevidade. No final da I Guerra Mundial, baseado na filosofia de Metchnikoff, em que a microbiota intestinal interfere na saúde, Isaac Carasso fundou a empresa Danone. Na mesma época, Minoru Shorota fundou a Yakult, fundamentando-se em pesquisas sobre bactérias ácido lácticas benéficas, as quais auxiliam no combate contra bactérias patogênicas. O estudo da microbiota intestinal em veterinária somente teve início nos anos 1960, com o uso de probióticos na criação de aves e bovinos e, posteriormente, em suínos. Na aquicultura, o uso de probióticos deu-se somente no final do século XX, inicialmente em peixes e, posteriormente, em crustáceos. O objetivo foi buscar uma forma alternativa de profilaxia (Lauzon et al., 2014).

A microbiota intestinal pode auxiliar no adequado desenvolvimento gastrointestinal, participar das funções digestivas e estimular respostas do sistema imune, além de conferir um grau de proteção contra infecções gastroentéricas (Merrifield et al., 2014). Conforme Brown, Sadarangani e Finlay (2013), a microbiota intestinal saudável, além de auxiliar no processo de digestão e absorção de nutrientes, também tem papel crucial na proteção contra micro-organismos patogênicos, por meio da competição por nutrientes e imunestimulação de células entéricas. Entretanto, devemos ter em mente que, ao contrário do que acontece com animais terrestres, grande parte da microbiota intestinal dos animais aquáticos é transitente. O intestino de camarões é revestido pela membrana peritrófica, a qual é semipermeável e acelular. Esta membrana, que reveste o intestino médio, isola o conteúdo intestinal do epitélio, dificultando a colonização do mesmo (Karunasagar et al., 2014). Os micro-organismos capazes de colonizar o trato digestivo por tempo prolongando, em particular o intestino médio, devem essa colonização ao fato de o intestino permanecer intacto durante a muda (Soonthornchai et al., 2015).

Segundo Huang e colab. (2014), a microbiota intestinal de *L. vannamei* varia também de acordo com a idade dos animais, conforme as Famílias abaixo:

- Pós-larva de 14 dias até juvenis de um mês: Comamonadaceae (Classe Betaproteobacteria)
- Juvenis de dois meses: Flavobacteriaceae (Bacteoidetes)

- Juvenis de três meses: Vibrionaceae (Classe Gammaproteobacteria)

Ainda de acordo com esses autores, micro-organismos das Famílias Flavobacteriaceae e Rhodobacteriaceae foram detectados, por pirosequenciamento, em todos os estágios de crescimento e, portanto, representam a principal flora microbiana de intestino de *L. vannamei*. Complementando esta informação, Cardona e colab. (2016) apontam que os micro-organismos mais frequentes no intestino de camarões são: Gammaproteobacteria Vibrionales, seguida de Alphaproteobacteria Rhodobacteraceae, Chloroplast Stramenopiles e Bacteroidia Bacteroidales. Já segundo Lakshmi, Viswanath e Gopal (2013), a microbiota intestinal predominantemente indígena de camarões marinhos são *Vibrio* e *Pseudomonas*, sendo que as bactérias ácido-láticas são, muitas vezes, subdominantes, em especial o gênero *Carnobacter*.

De forma interessante, ainda não há um consenso sobre o quanto o ambiente externo pode influenciar na composição da microflora intestinal de camarões. Segundo um estudo recente (Cardona et al., 2016), a comunidade microbiana intestinal destes animais é influenciada pelo ambiente. De acordo com os autores, a microbiota de camarões produzidos em água clara reflete a microbiota marinha, assim como camarões produzidos em bioflocos terão sua microbiota intestinal influenciada pelas variações físicas que ocorrem no bioflocos, tais como flutuações na clorofila, pH, nitrogênio, entre outros. Em contrapartida, Tzeng e colab. (2015) concluíram que a genética de camarões tem maior influência na composição da microbiota intestinal do que o ambiente onde estes animais se encontram.

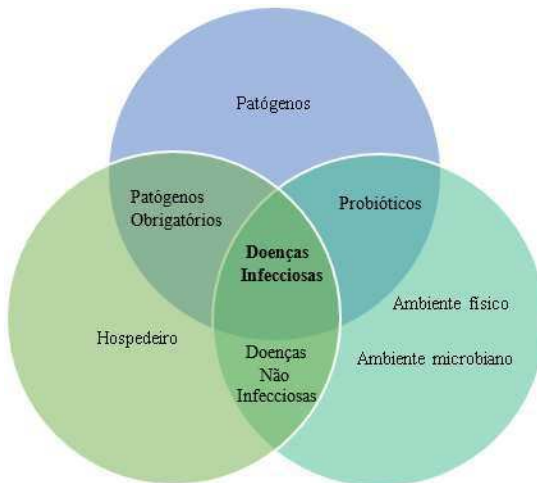
Portanto, analisando diversos autores, deve-se ter em mente que as populações de micro-organismos intestinais podem ser transitórias ou residentes, além de sofrerem influência de fatores como formulação de dieta, aspectos fisiológicos do hospedeiro e variações ambientais.

Em *L. vannamei*, algumas espécies de bactérias já foram descritas, tendo ação antagonista frente a patógenos, tais como *Lactobacillus plantarum* que, apesar de por tempo limitado, controlou a infecção por *Vibrio harveyi* (Vieira et al., 2008); e *Pediococcus pentosaceus* e *Staphylococcus haemolyticus*, os quais foram utilizados como probióticos em camarões naturalmente infectados com WSSV (Leyva-Madrugal et al., 2011). Por meio de tecnologia de DNA recombinante, esporos de *Bacillus subtilis* associados à proteína viral VP28, do WSSV, possibilitaram uma sobrevivência de 83,3% em *L. vannamei* infectados com WSSV, tendo sido observado que esses

esporos associados à proteína viral induziram o aumento da taxa de fagocitose por parte dos hemócitos (Fu et al., 2011).

De fato, a interação entre hospedeiro, micro-organismo e ambiente é muito rica. Diferentes interações podem gerar diferentes quadros. Conforme o conhecido diagrama de Sneyzko Venn aplicado a esta relação, micro-organismos podem ser patogênicos, oportunistas ou até mesmo ambientais. (Figura 8). Doenças não infecciosas resultam da interação unicamente entre hospedeiro e ambiente. A relação entre patógeno e hospedeiro pode resultar em patógenos obrigatórios, sendo esta relação muito perigosa, pois não necessita de qualquer estresse ou distúrbio ambiental para causar doença clínica. Micro-organismos considerados probióticos, ou com possível ação probiótica, são aqueles que, não causando infecção, estão presentes no ambiente, seja este ambiente físico como a água de cultivo, ou ambiente microbiano como no tubo digestivo, e que auxiliam no controle dos micro-organismos patogênicos. Por fim, claramente doenças infecciosas decorrem da associação entre hospedeiro, ambiente e patógeno (Owens, 2012). Competem aos mais recentes estudos e pesquisas, o entendimento e a classificação dos micro-organismos descritos nos diferentes ambientes e hospedeiros.

Figura 8: Diagram de Sneyzko Venn mostrando a interação entre hospedeiro, patógeno e ambiente.



Fonte: Adaptado de Owens (2012).

Como ferramenta complementar à gestão frente a enfermidades, o uso de probióticos na aquicultura vem ganhando espaço. O termo probiótico já recebeu diversas definições. Nesta revisão, podemos entendê-lo como qualquer micro-organismo ou célula microbiana adicionada via alimentação ou ambiente (água), conferindo benefícios ao hospedeiro e, como consequência, ao produtor e, posteriormente, ao consumidor final (Merrifield et al., 2010).

Contudo, o uso de probióticos também confere outros benefícios, além dos já mencionados acima, tais como redução da população de algas no viveiro, redução nos níveis de nitrogênio e fósforo e participação na decomposição da matéria orgânica. Portanto, o uso de probióticos também auxilia na manutenção de uma satisfatória qualidade de água, principalmente quando pensamos em um sistema super intensivo, com baixa ou troca zero de água (Jory; Cabrera, 2012).

A grande maioria dos micro-organismos probióticos encontram-se no grupo das bactérias Gram positivas; dentre estas, as bactérias ácido lácticas são consideradas as mais adequadas, devido suas habilidades antagonistas frente a bactérias patogênicas (Merrifield et al., 2014). Algumas bactérias Gram negativas também já foram descritas com efeitos probióticos, porém geralmente são bactérias autóctones e com uso comercial limitado (Castex; Daniels; Cheim, 2014). Em crustáceos, micro-organismos já são estudados com possível ação probiótica, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2: Micro-organismos com possível ação probiótica em crustáceos.

MICRO-ORGANISMOS COM POSSÍVEL AÇÃO PROBIÓTICA			
Bactérias Gram positivas	Bactérias Gram negativas	Leveduras	Microalga
<i>Bacillus</i> spp	<i>Vibro</i> spp	<i>Saccharomyces</i> spp	<i>Tetraselmis</i> sp
<i>Micrococcus</i> sp	<i>Pseudomonas</i> spp	<i>Phaffia</i> sp	
<i>Lactobacillus</i> spp	<i>Bdellovibrio</i> spp		
<i>Lactococcus</i> spp	<i>Aeromonas</i> spp		
<i>Pediococcus</i> sp	<i>Alteromonas</i> spp		
<i>Arthrobacter</i> sp	<i>Halomonas</i> sp		

Fonte: Castex, Daniels, Cheim (2014).

Por fim, a identificação e caracterização de bactérias presentes nos camarões e na água de produção podem ser realizadas através de seleção em meio de cultura, por métodos bioquímicos e por métodos moleculares. Contudo, estima-se que apenas 10 a 50% da população de

bactérias do sistema digestório de camarões sejam cultiváveis (Holzapfel et al., 1998). De fato, se pensarmos em comunidade microbiana de forma geral, somente cerca de aproximadamente 0,1 a 10% dos micro-organismos são cultiváveis (Head; Saundersm; Pickup, 1998). Métodos moleculares independentes de seleção em meios de cultura, como por exemplo, a Reação em Cadeia da Polimerase - PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguida de sequenciamento do DNA amplificado, permitem uma identificação mais rápida e mais completa, ou abrangente, principalmente em ecossistemas complexos (Muyzer; Smalla, 1998). A análise filogenética e taxonômica da sequência do gene ribossomal 16S (16S rRNA), o mais usado para análise taxonômica e filogenética em procariotos, representa o que há hoje de mais moderno em termos de técnicas de identificação de micro-organismos em Biologia Molecular.

Porém, deve-se ter em mente que a análise do gene 16S rRNA não rouba o mérito da análise microbiológica clássica. Podemos hoje identificar micro-organismos independentemente de técnicas de cultura; contudo, ainda é muito difícil inferir a fisiologia e o papel ecológico dos micro-organismos sem poder cultivá-los e realizar experimentação em laboratório. Muitos microbiologistas acreditam que todo micro-organismo vivo achado na natureza é capaz de ser cultivado em laboratório, desde que com as condições ideais. Sobre esta questão, há ainda um debate no meio científico (Kirchman, 2012).

O gene 16S rRNA é encontrado em todas as bactérias e arqueas, sendo também encontrado em mitocôndrias e cloroplastos de eucariotos. Diferentes regiões do gene 16S rRNA apresentam variabilidades distintas, desde uma região altamente conservada, a qual é muito semelhante em todos os organismos, até regiões com alta variabilidade, as quais diferem grandemente entre organismos. As regiões altamente conservadas são úteis na análise comparativa de amostras complexas; as regiões variáveis são utilizadas para distinguir um grupo de micro-organismo de outro. Entende-se que o gene apresenta regiões altamente conservadas, pois este codifica para um componente importante para as funções ribossomais, onde alterações podem levar a mutações deletérias e não toleradas. As análises filogenéticas resultantes do estudo do gene 16S rRNA corroboram outras análises filogenéticas realizadas com outros genes, além de representarem a história evolutiva dos micro-organismos, sendo que a identificação taxonômica é possível devido a presença de nove regiões hipervariáveis (Kirchman, 2012).

Todavia, ao se analisar a diversidade bacteriana utilizando o gene 16S rRNA, deve-se ter em mente alguns contrapontos. Muitas

bactérias possuem diversas cópias desse gene. Estima-se que, em média, cada bactéria presente no oceano tenha 1,8 16S rRNA gene por genoma, o que pode superestimar a abundância de bactérias na natureza (Biers et al., 2009). Como já mencionado anteriormente, dois micro-organismos podem ter semelhança genética, apesar de diferirem em termos de fisiologia e ecologia, visto que o gene 16S rRNA é muito conservado (Kirchman, 2012).

Tendo isto em mente, a análise do gene 16S rRNA para caracterização de micro-organismos é de grande valia para o estudo de comunidades microbianas. Como vantagens, podemos citar: a ocorrência universal em todos os organismos procariotos; a existência de regiões longas e altamente conservadas, as quais são úteis para estudo de relações filogenéticas distantes; a presença suficiente de regiões variáveis que permitem avaliação de relações filogenéticas próximas; e a não propensão a rápidas mudanças na sequência, servindo, então, como cronômetro evolutivo (Reineke; Devi, 2013).

9. Contextualização e justificativa do presente estudo

Um dos pilares preconizados atualmente para o mundo contemporâneo é a sustentabilidade. A aquicultura, inserida neste contexto, deve visar realizar a produção animal tendo em mente algumas características específicas, referentes às boas práticas de manejo, tais como:

- Uso sustentável da água e da terra, minimizando o impacto negativo ao meio ambiente;
- Evitar a introdução de espécies exóticas ou transgênicas no meio ambiente;
- Uso responsável e mínimo de químicos que possam causar dano ao meio ambiente, a animais e/ou a seres humanos;
- Reduzir uso de estoques selvagens;
- Implementar práticas de controle sanitário;
- Otimizar os benefícios sociais e econômicos advindos da atividade;
- Garantir direitos e bem-estar ao corpo técnico dos empreendimentos.

Especificamente sobre a implementação de práticas relativas à saúde animal, buscam-se bioseguridade, tecnologias que reduzam o estresse e que envolvam o manejo sanitário adequado, alta qualidade do produto final, transporte responsável de animais vivos ou de seus

subprodutos, além da implementação de estratégias que minimizem ao máximo o alastramento de doenças para além das fazendas (FAO, 2001b).

Com esta perspectiva, a produção de camarões em meio com bioflocos mostra-se de grande relevância, devido ao seu aspecto sustentável e biosseguro.

Ainda que as doenças infecciosas sejam o maior obstáculo à aquicultura atual, em particular para a carcinicultura, o entendimento das técnicas e opções de controle das infecções, especialmente as virais, tem melhorado com o passar dos anos, especialmente devido a experiências vividas por produtores da Ásia e da América Latina, auxiliada pelos constantes estudos em excelentes centros de pesquisa. Contando com o uso de ferramentas, tais como a manipulação da microbiota intestinal e o conhecimento das patogenias, podemos afirmar que a aquicultura tem ainda um grande potencial de crescimento, em especial no Brasil, tanto por suas características continentais, quanto pela diversidade climática e qualidade de produção.

Relativamente poucos projetos baseados em estratégias metodológicas de Biologia Molecular têm sido realizados de forma sistemática envolvendo cultivos de camarão em sistema de bioflocos. Visto que este sistema tende a ser cada vez mais escolhido por produtores de camarão engajados com tecnologia de alto nível e alta produtividade, fazem-se necessárias a caracterização e a identificação microbiológica e molecular da microbiota nele presente. Estudos que caracterizem e descrevam os micro-organismos presentes no sistema de bioflocos na carcinicultura são essenciais para que a atividade alcance ótimos níveis tecnológicos e de produtividade, tornando-se, ainda, ambientalmente correta e economicamente viável.

Atualmente, toda a produção animal busca minimizar significativamente e/ou não mais usar compostos químicos como forma de tratamento de infecções que os animais possam vir a enfrentar. Busca-se, de forma sábia, a prevenção por meio da manipulação de micro-organismos presentes na água de cultivo e no animal, com ênfase na microbiota intestinal, aliado a boas práticas de manejo. Portanto, conhecer a microbiota presente no ambiente aquático de cultivo, bem como no intestino de camarões contribui, incentiva e favorece o correto uso de prébióticos e probióticos na carcinicultura. Além disso, o conhecimento de flutuações desta microbiota frente a quadros patogênicos permite o desenvolvimento de parâmetros referência de sanidade animal.

Visto que um dos grandes desafios da carcinicultura atual é representado pelas infecções, principalmente aquelas de etiologia viral, mostra-se de fundamental importância o conhecimento da patogenia da Síndrome da Mancha Branca, a qual tem sido a mais problemática infecção viral em camarões ao redor do globo, desde a década de 90. O entendimento sobre os mecanismos moleculares que envolvem a infecção do vírus da síndrome da mancha branca em *Litopenaeus vannamei*, bem como as respostas moleculares do hospedeiro, propicia o desenvolvimento de métodos de prevenção e controle deste vírus altamente patogênico para a carcinicultura, podendo, ainda, fornecer subsídios para a seleção de indivíduos menos susceptíveis.

Neste contexto, o presente estudo avaliou, a partir do nível de transcritos de alguns genes alvo, as respostas moleculares de camarões *L. vannamei* frente ao WSSV, em diferentes tecidos, em duas condições de cultivo distintas: água clara tratada (ACT) e bioflocos (BFT). Paralelamente, visando avaliar a influência do WSSV na microbiota intestinal, assim como na microflora da água circundante nestas duas condições, essa microbiota foi analisada e caracterizada com base no gene 16S rRNA.

Os resultados deste trabalho experimental serão publicados, respectivamente, nos seguintes periódicos:

1. “Molecular responses in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, kept in biofloc and in clear seawater and challenged with the White Spot Syndrome Virus.”
Aquaculture Research
2. “Comparative profile of intestine microbiota in WSSV infected shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under two different rearing systems.”
Journal of Applied Microbiology

10. Objetivos

10.1 Geral

Avaliar respostas moleculares de defesa de *Litopenaeus vannamei* frente à infecção pelo Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), relacionando-as com o microbioma do seu trato digestivo, em dois diferentes sistemas experimentais de cultivo, água clara e bioflocos, a fim de fornecer subsídios para as medidas que buscam minimizar o impacto deste agente patogênico sobre os cultivos.

10.2 Específicos

- Avaliar o perfil transcricional de genes alvo relacionados à defesa molecular em brânquias, hepatopâncreas e hemócitos de *Litopenaeus vannamei* infectados experimentalmente com o WSSV e mantidos em dois sistemas experimentais de cultivo diferentes, a saber, água clara (AC) e bioflocos (BFT);
- Caracterizar a biodiversidade molecular da microbiota presente na água de dois sistemas experimentais de cultivo diferentes: ACT e BFT.
- Caracterizar a microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei*, antes e após infecção experimental com o WSSV.

CAPÍTULO 1

Transcrição de genes de defesa no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, mantidos em bioflocos e em água clara e desafiados com o vírus da síndrome mancha branca.

Cecília de Souza Valente¹, Karla Oliveira Ortiz¹, Rachel Depperschmidt², Ana Paula de Medeiros Fraga¹, Felipe do Nascimento Vieira³ & Maria Risoleta Freire Marques^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

²Programa MHIRT / NIH, Christian Brothers University, Memphis, TN, Estados Unidos da América

³Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

*Autor para correspondência: MRF Marques, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88040-900. E-mail: risoleta.marques@ufsc.br

Resumo

A carcinicultura em sistema com bioflocos (BFT) mostra-se como uma alternativa sustentável, reduzindo os impactos ambientais devido à troca zero de água. O sistema BFT também se apresenta como ferramenta para a biosegurança da produção, além de fonte adicional de alimento para os camarões. A síndrome da mancha branca é considerada a doença de etiologia viral mais devastadora para a carcinicultura, responsável por negativos impactos socioeconômicos em nível mundial. Neste trabalho comparamos as taxas de sobrevivência e os perfis de transcrição de genes alvo em diferentes tecidos de espécimes juvenis do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, mantidos em BFT, ou em sistema convencional com água clara (ACT), após desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Após a infecção experimental, a taxa de sobrevivência foi maior entre os camarões mantidos em ACT, os quais também apresentaram menor carga viral 48

horas após a infecção. Um único camarão sobreviveu 72 horas pós-infecção no BFT, representando, provavelmente, um padrão de menor susceptibilidade ao vírus. Não houve diferença significativa quanto ao perfil de transcrição dos genes alvo entre BFT e ACT, antes da infecção viral, sugerindo que a transcrição gênica possa ter sido modulada pela presença do vírus. As alterações no perfil de genes alvo foram mais frequentemente observadas no hepatopâncreas. Dos onze genes alvo selecionados, aqueles que codificam para *Calreticulina*, *β -tubulina* e *ProPO* mostraram regulação positiva mais significativa, seguidos de *QM*, *SOD* e *Ubiquitina*. Embora BFT seja considerado um sistema biosseguro, os camarões mantidos neste sistema não, necessariamente, respondem de forma mais eficaz frente a patógenos altamente virulentos, como o WSSV.

Palavras-chave: bioflocos, camarão, transcrição gênica, WSSV.

1. Introdução

As condições de cativeiro podem acarretar maior susceptibilidade dos camarões a diferentes patógenos, como bactérias, vírus, parasitas e fungos, mas são as epidemias de etiologia viral as responsáveis por significativas perdas econômicas (Lightner et al., 2012). A doença da mancha branca (WSD) tem sido desde a década de 90 a doença viral mais devastadora para a carcinicultura, levando a grandes impactos socioeconômicos negativos em todo o mundo. O seu agente etiológico, o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) pode ser altamente virulento, levando à mortalidade em massa (80-100%) nos tanques, em poucos dias (três a dez dias), após início dos sinais clínicos.

A tecnologia de bioflocos (BFT) apresenta-se como uma alternativa sustentável à carcinicultura tradicional, uma vez que reduz os impactos ambientais devido à reutilização de nutrientes, além de requerer pouca ou nenhuma troca de água. É caracterizado como um sistema intensivo, onde os animais aquáticos são criados em altas densidades. Os agregados de micro-organismos, associados a partículas, colóides, polímeros orgânicos e células mortas, estão presentes na coluna de água, com a predominância de bactérias aeróbicas heterotróficas. A principal vantagem do BFT é ser considerado mais biosseguro, pois a introdução

de agentes patogênicos no sistema é menos provável (Crab et al., 2012, Cardona et al., 2016).

Os crustáceos não apresentam sistema imune adaptativo. No entanto, suas eficientes respostas de defesa são baseadas em seu sistema imune inato, o qual compreende componentes celulares e humorais (Hauton, 2012). Além disso, suas respostas de defesa também dependem de outras vias bioquímicas. Portanto, investigar respostas moleculares relacionadas aos diversos processos biológicos, tais como respostas de defesa antioxidante, apoptose, translocação de proteína, *turnover* proteico e vias energéticas, contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na complexa resposta contra patógenos, bem como na alteração da bioquímica celular, em consequência do início da infecção patogênica.

Como parte do sistema de defesa antioxidante, a enzima superóxido dismutase (SOD) é digna de estudos. Esta enzima catalisa a dismutação do superóxido para moléculas inofensivas, produzidas após o processo de fagocitose e que podem ser usadas como indicadores de estresse (Smith et al., 2014).

Sobre o sistema imune inato de invertebrados, uma das principais respostas em crustáceos é o sistema de ativação da profenoxidase (proPO), a qual compõe a síntese bioquímica da melanina. A síntese deste pigmento inclui moléculas citotóxicas, como resposta do hospedeiro à infecção ou ao trauma (Smith et al., 2014). Além do próprio gene *proPO*, Xu, Wu e Zhang (2008) sugeriram que o gene *QM* também participa da cascata proPO. A apoptose, a qual elimina células infectadas com vírus e outros agentes patogênicos (Smith et al. 2014), envolve o produto do gene *QM*, isto é, uma proteína apoptótica.

Portanto, para melhor compreender as respostas moleculares do camarão *Litopenaeus vannamei* frente a infecção pelo WSSV, analisamos o perfil de transcrição de genes alvo em camarões desafiados experimentalmente com o vírus, e mantidos em dois sistemas de cultivo experimental diferentes, BTF e água clara tratada (ACT). Além disso, analisamos comparativamente as taxas de sobrevivência e a quantificação do vírus nos camarões em ambos os sistemas de cultivo.

2. Material e Métodos

a. Espécimes e condições de aclimação

Os camarões foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/CCA/LCM). O referido laboratório emprega práticas de manejo sanitário adequadas, sendo os camarões utilizados provenientes de um sistema de produção BTF maduro.

Um total de 168 espécimes juvenis de *Litopenaeus vannamei* com $8,0 \pm 1,0$ gramas foram coletados aleatoriamente e aclimatados por um período de quinze dias: 84 animais em um sistema BTF quimioautotrófico, enquanto 84 em água clara tratada (ACT). A ACT é um sistema utilizado exclusivamente para experimentação. No LCM, a aclimação dos camarões em ACT foi realizada em um tanque com capacidade de 5000 L, com um sistema de renovação contínua de água do mar filtrada, com aeração constante e tratada com luz UV, enquanto que os camarões no sistema com BFT foram mantidos em um tanque com capacidade de 1000 L, nas condições preconizadas para esse sistema, ou seja, sem renovação de água e com forte aeração central por Aero-Tube™. Este tanque foi coberto com uma rede escura a fim de criar sombreamento, limitando assim a incidência de luz solar e evitando que os camarões saltassem do tanque.

Durante o período de aclimação, todos os camarões foram alimentados diariamente com ração comercial. A alimentação foi calculada para 3% da biomassa, dividida três vezes ao dia.

A qualidade da água em ambos os sistemas era avaliada duas vezes ao dia para temperatura e oxigênio dissolvido, assim como duas vezes por semana para pH, amônia, nitrito, nitrato, fosfato, salinidade, alcalinidade, turbidez e sólidos suspensos totais. Caso a alcalinidade apresentasse valor inferior a 120 mg.L^{-1} , era adicionada cal hidratada $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$, na proporção de 20% a 30% da alimentação. Semelhantemente, quando a gravimetria revelasse valor superior a 600 mg.L^{-1} , ou a determinação pelo cone de sedimentação Imhoff resultasse em volume superior a 4 mg.L^{-1} , removiam-se os sólidos suspensos totais por decantadores.

Ao final deste período de aclimação, os animais de cada tanque de cada sistema foram distribuídos aleatoriamente em tanques menores (unidades experimentais), conforme detalhado no item 2b.

b. Infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

Ao final dos quinze dias, os animais ($10 \pm 1,2$ g) foram distribuídos aleatoriamente em quatorze aquários de 25 L cada, contendo ACT ou BTF, de acordo com sua condição original de aclimação ($n = 12$ camarões por aquário), e com densidade inicial de 480 camarões/m³.

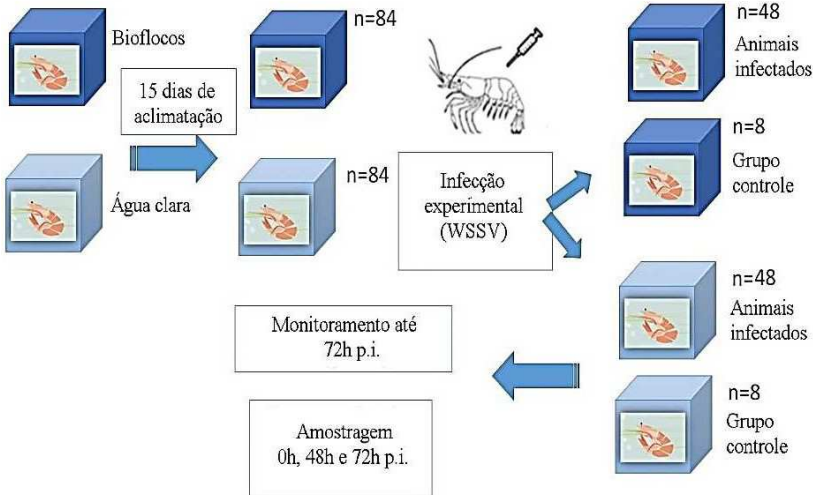
Após um período de 36h nos novos aquários, 96 camarões foram individualmente infectados com um inóculo de WSSV ($5,3 \times 10^4$ vírus. ml⁻¹/animal), preparado conforme descrito por Valentim-Neto e colab. (2014). Os camarões foram inoculados através de uma injeção intramuscular com 100 µl do inóculo, no terceiro segmento abdominal da região dorsal, utilizando uma seringa estéril de 1 ml. Como grupo controle para cada sistema (ACT e BTF), camarões ($n = 8$ / sistema) foram injetados da mesma forma e com igual volume, porém com solução salina marinha estéril.

A sobrevivência dos camarões foi monitorada até 72h após a infecção. Ao longo deste período, foram ainda monitoradas possíveis mudanças de comportamento, coloração corporal, consumo de ração e, eventualmente, sinais clínicos visíveis externos.

c. Amostragem

Os animais foram amostrados aleatoriamente e os tecidos foram coletados individualmente em três momentos: antes do desafio viral (0h), 48h pós-infecção (p.i.) e 72h p.i. Após anestésiar os animais por hipotermia, a hemolinfa foi extraída usando-se uma seringa estéril de 1 ml, contendo 500 µL de solução de Alsever modificada e gelada (1:1) (Chen et al., 2011). Hepatopâncreas, brânquias e pleópodes foram coletados usando-se tesoura e pinças previamente esterilizadas. Em cada coleta, foram amostrados quatro animais por tanque. Os tecidos coletados foram imediatamente transferidos para um microtubo estéril DNase e RNase *free*. A hemolinfa foi imediatamente centrifugada a $800 \times g$ durante 10min a 4 °C, para separar o plasma dos hemócitos. As amostras foram inicialmente mantidas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -80 °C para análise posterior. A Figura 1 apresenta o esquema ilustrativo do desafio viral experimental.

Figura 1: Esquema ilustrativo do desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) em *Litopenaeus vannamei*, mantidos em dois sistemas experimentais, i.e., **bioflocos** e **água clara**.



12 aquários de bioflocos, 12 aquários de água clara e 2 aquários controles. Número de animais por coleta: 56 camarões; 3 coletas ao todo.

Fonte: a autora.

d. Quantificação viral

d.1 Preparação das amostras para extração de DNA

Um volume de 100 ml de água de ambos os sistemas (BFT e ACT) foi filtrado através de um filtro de membrana de 0,22 μm e, então, lavado duas vezes com um volume igual de água tamponada estéril (Rivera et al., 2003). Posteriormente, os filtros foram cortados em quatro partes e $\frac{1}{4}$ foi usado para realizar a extração de DNA.

As amostras de sedimento de bioflocos (250 μl) foram lavadas duas vezes com a mesma água tamponada descrita acima e então centrifugadas por 5min, a 3080 x g, a 4 $^{\circ}\text{C}$, antes da extração de DNA.

Dos pleópodes, foi utilizado um total de 100 mg do tecido para extração total de DNA (48h p.i. e 72h p.i.).

d.2 Extração de DNA

A extração de DNA foi efetuada nas condições descritas previamente por Moser (2011). Esta foi realizada a partir dos tecidos coletados e armazenados como descrito acima, em uma solução de lise com TE 1x, SDS a 1% e proteinase K (1 mg.ml^{-1}), incubados a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 1h. A incubação foi seguida pela adição de NaCl 5 M e CTAB 10% à mistura, e nova incubação a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40min. Em seguida, adicionou-se clorofórmio-isoamílico, homogeneizou-se a mistura e a mesma foi centrifugada a $14000 \times g$ durante 8min, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Os sobrenadantes foram separados em um novo microtubo e adicionou-se isopropanol. O precipitado de DNA foi lavado com etanol duas vezes, eluído em água para biologia molecular ultrapura e mantido a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o uso.

Para avaliar o grau de pureza das amostras de DNA, a relação dos valores de Absorbância a 260/280 nm e 260/230nm foram mensurados em espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000, ThermoScientific®).

d.3 Quantificação viral por PCR quantitativa em tempo real (RT-*q*PCR)

A quantificação viral foi realizada por RT-*q*PCR, a partir do DNA extraído das amostras, conforme descrito acima, utilizando os iniciadores WS1F (5'-CGTGCTGGCGATGACATTCCAATA-3') e WS1R (5'-TTGAACCATCAAGACTCGCCCTCT-3'). O par de iniciadores foi desenhado por Müller (2009), com base no produto de PCR *nested*, obtido a partir dos iniciadores descritos anteriormente por Lo e colab. (1996), amplificando como resultado um produto de 126 pb.

As reações de amplificação em tempo real foram realizadas utilizando o equipamento Rotor-Gene TM 6000 (Qiagen®), em um volume final de $20 \mu\text{L}$. O *mix* de reação consistiu em QuantifastTM SYBR® Green (Qiagen®), $1 \mu\text{M}$ de cada iniciador, além de $100 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de DNA. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10min, seguida de 45 ciclos a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 30s e $72 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 10s. Ao final dos ciclos, uma curva de dissociação (*melting*) foi realizada com o produto obtido, aumentando-se a temperatura em $1 \text{ }^\circ\text{C}$ a cada 5s, na faixa de $72 \text{ }^\circ\text{C}$ a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, a fim de confirmar a especificidade dos iniciadores.

Foram realizadas duas repetições da reação de *q*PCR (duplicata), sendo cinco repetições biológicas para cada grupo experimental (48h

p.i., 72h p.i., controles; BFT e ACT). A curva padrão, necessária para a quantificação precisa, foi baseada em uma curva de concentração, obtida a partir de diluições seriadas ($3,5 \times 10^7$ a 3,5 cópias/ μ l) de um plasmídeo contendo o fragmento alvo do WSSV (produto do segundo passo da PCR *nested*), conforme descrito anteriormente por Müller (2009). Aliquotas de água para biologia molecular ultrapura foram incluídas como controle negativo. As condições para resultados aceitáveis foram baseadas na eficiência entre 0,95 - 1,05, R^2 (coeficiente de correlação) > 0,98 e M (inclinação da reta) -3.

e. Análise do nível de transcritos de genes alvo

e.1 Extração de RNA

O RNA total foi extraído de brânquias, hemócitos e hepatopâncreas, dos grupos experimentais pré-infecção (tempo 0h) e 48h p.i. Foi utilizado o reagente QIAzol Lysis Reagent (Qiagen®), de acordo com as instruções do fabricante. A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o reagente QuantiTec Reverse Transcription (Qiagen®), de acordo com as recomendações do *kit*. A qualidade do RNA extraído e do cDNA obtido foram averiguadas com base nas relações de densidade óptica a 260/280 nm e 260/230 nm, utilizando um espectrofotômetro UV (NanoDrop 2000, ThermoScientific®).

e.2 PCR quantitativa em tempo real (RT-*q*PCR)

Os ensaios de RT-*q*PCR foram realizados para avaliar os níveis de transcrição de genes alvo. Os genes alvo foram selecionados com base em uma biblioteca subtrativa supressiva (SSH) de cDNA, previamente obtida por nosso grupo (Müller et al., submetido), utilizando camarão cultivado e naturalmente infectado com WSSV (WSSV +) *versus* camarão cultivado não infectado (WSSV -). Os iniciadores foram projetados com o programa Primer Quest (Integrated DNA Technology, Inc.), com base nos genes identificados na biblioteca de SSH de cDNA. Os genes alvo escolhidos, bem como os respectivos iniciadores utilizados estão mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados para RT-qPCR

Gene alvo	Categoria funcional ou Denominação	Sequência (5' → 3')	Referência
<i>β-tubulina</i>	Proteína do citoesqueleto	AAG ATG GCC TCT ACC TTC ATC GGT AGC CTT TCG CCT GAA CAT AGC AGT	Müller et al., submetido
<i>Calreticulina</i>	Homeostase do cálcio	CTC TTT TGC TCC TCT TCA TC CCT CAT CTC CAA TGC TCC TG	Müller et al., submetido
<i>Fator de alongação 1-α</i>	Fator de translocação	TGG AGA CTG GTA TCC TGA AG GCA TCT CCA CAG ACT TTA CC	Müller et al., submetido
<i>GAPDH</i>	Via glicolítica	CTG TGG CGT TAA CTT GGA ATG AGG CCC TCT ACT ATC TC	Maciel, 2002
<i>H1</i>	Histona	CCGCGAAAGAAGCCAGCTGTTA AGGGGTGCGACGGTCAAGTATT	Cottin et al., 2010
<i>proPOI</i>	Sistema profenoxidase	CGGTGACAAAAGTTCCCTCTTC GCAGGTCGCCGTAGTAAG	Wang, et al., 2007
<i>QM</i>	Proteína apoptótica	GAT AAC GTG GTA AGG GTG TAG	Müller et al., submetido

<i>Ran</i>	Proteína nuclear com atividade antiviral	CGT ATC TGC GCC AAC AAG TAT CCAGAGCAAGCGAGGTATCC TTGTAGAAAGGTATGATGCCAGATCCT	Kim et al., 2014
<i>SEC 61</i>	Translocação de proteínas	GAC CAT AAT GAG ACC TGC TC CAA TAG CTG TAG CCA TGG AG	Müller et al., submetido
<i>SOD</i>	Estresse oxidativo	TCATGCTTTGCCACCTCTC CCGCTTCAACCAACTTTCTTC	Moser, 2011
<i>Ubiquitina</i>	<i>Turnover</i> proteico	AAG GCC AAG ATC CAG GAT AAG GAG AGT CAG ACA GAC TGC GAC CAT CTT	Müller et al., submetido
<i>rRNA 18S de decápodes</i>	Componente estrutural do ribossomo	CCG AAT GGT CGT GCA TGG AAT GAT GAA TTT CAC CTC TAG CGT CGC AGT	Moser, 2011

As reações de amplificação foram realizadas com o *kit* Quantifast SYBR Green (Qiagen®), em um volume final de 20 μl , utilizando-se 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de cDNA por amostra. As condições de amplificação foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C durante 5min, seguida por 50 ciclos de 95 °C por 10s e 60 °C por 30s, e, ao termino dos ciclos, uma curva de dissociação, em intervalos ascendentes de 1 °C, na faixa de 55 °C a 95 °C. Entre os genes testados, o gene que codifica para o RNA ribossômico 18S de decápodes (18S rRNA) foi utilizado para controle interno, como gene referência. As amostras foram preparadas com duas repetições da reação de PCR, com um total de dez repetições biológicas para cada grupo experimental (pré-infecção, tempo zero, e, 48h p.i.). Como controle negativo, todos os ensaios incluíram alíquotas de água para biologia molecular ultrapura. O cálculo para a avaliação comparativa dos níveis de transcritos (expressão relativa) foi realizado pelo método comparativo do valor do *threshold cycle* (ciclo limiar) ou valor de Ct ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) (Livak & Schmittgen, 2001). Os parâmetros de aceitação dos resultados foram os mesmos descritos para a quantificação viral. Alterações no nível de transcritos gênicos foram consideradas quando acima de 1,5 vezes.

f. Análise estatística

A análise das diferenças nos níveis de transcritos dos genes alvo foi baseada nas seguintes comparações: entre BFT e ACT, antes (0h) e após 48h da infecção viral; e, em cada sistema, pré-infecção *versus* pós-infecção. Os resultados estatísticos para esta análise foram determinados através do teste t para amostras independentes, com nível de confiança de 95%.

3. Resultados

a. Níveis de transcritos de genes alvos nos sistemas experimentais

A comparação do perfil de transcrição dos camarões mantidos em ACT *versus* aqueles mantidos em BFT revelou diferenças somente frente ao desafio viral, i.e., apenas após a infecção viral.

Após a infecção pelo WSSV, as brânquias dos animais provenientes dos tanques de ACT mostraram ser o tecido cujo perfil de transcritos foi compatível com uma maior indução gênica.

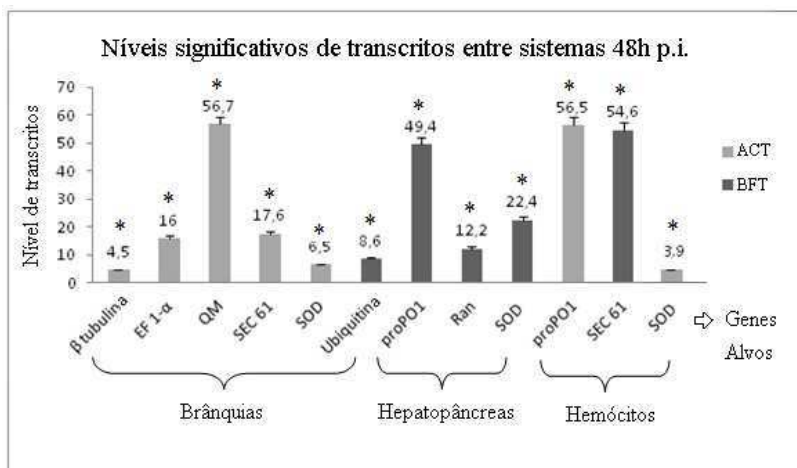
Os genes *Calreticulina*, *GAPDH* e *H1* não apresentaram diferenças nos níveis de seus respectivos transcritos, ou seja, não foi observada diferença no número de transcritos para esses genes entre os camarões infectados pelo WSSV, independente do sistema experimental nos quais os animais foram mantidos (ACT ou BFT).

Por outro lado, os genes *QM*, *proPO1* e *SEC 61* destacaram-se, mostrando elevada regulação positiva ($\approx 50x$), após a infecção viral, tanto em ACT, como em BFT, e nos três tecidos analisados (Figura 4).

Logo, os resultados relativos à comparação ACT *versus* BFT indicam que a infecção pelo WSSV influenciou de forma semelhante as respostas moleculares nas brânquias e no hepatopâncreas do hospedeiro, associadas aos genes analisados, independente do sistema.

Cabe destacar que essa similaridade entre as repostas registradas nos dois sistemas, ACT e BFT, não foi observada no caso dos hemócitos. Por outro lado, naturalmente, houve diferenças nessas mesmas repostas moleculares, antes e após a infecção, nos dois sistemas, i.e., ACT e BFT. Neste caso, as repostas foram mais proeminentes nas brânquias.

Figura 2: Perfil comparativo do nível de transcritos de genes alvo em *Litopenaeus vannamei*, entre sistemas distintos, i.e., bioflocos (BFT) e água clara (ACT), 48h após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).



BFT: bioflocos; ACT: água clara. Quantificação relativa do número de transcritos em relação ao gene rRNA 18S, utilizado como referência. Eixo y indica número de vezes em que o gene foi induzido ou reprimido. Nível de significância: 95%. * diferencialmente transcrito.

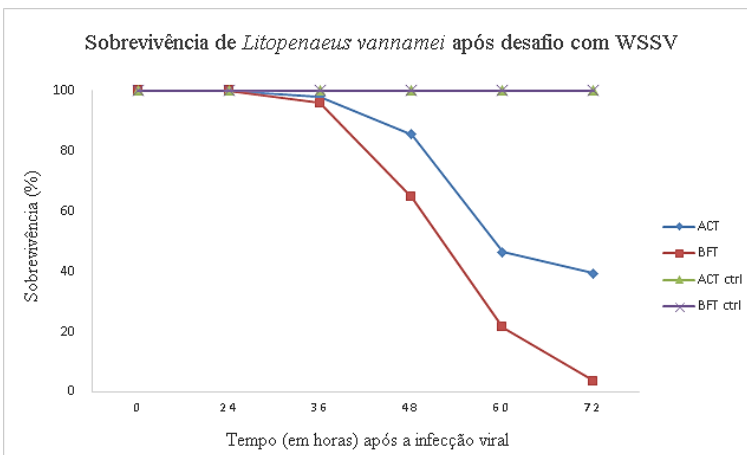
b. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* frente ao desafio viral com WSSV

Em nosso desafio experimental, nenhuma mortalidade foi registrada nas primeiras 24h p.i., em nenhum dos tanques, independente do sistema (ACT ou BFT). Contudo, alguns sinais clínicos foram observados nesse período, como letargia, corpo delgado e avermelhado, e redução no consumo alimentar. Após 24h, os sinais clínicos se intensificaram, e tendo sido observadas as primeiras mortes, em ambos os sistemas (ACT e BFT).

A taxa de sobrevivência dos camarões em ACT e BFT foi significativamente diferente, i.e., houve maior mortalidade nos tanques de bioflocos (BFT). Ademais, as mortes ocorreram mais rapidamente dentre os animais mantidos em BFT, em relação aos animais mantidos em ACT. Em 72h p.i., observamos um pequeno número de animais com infecção subclínica (camarão assintomático). A mortalidade cumulativa foi maior em 48h p.i. em relação a 72h p.i.

Apenas um animal sobreviveu ao desafio viral por 72h, em BFT. Este mesmo indivíduo não apresentou quaisquer sinais clínicos visíveis. Os dados de sobrevivência (%) registrados ao longo do experimento estão apresentados na Figura 2. Ressaltamos que não foi observada nenhuma morte entre os camarões dos grupos controle (tanto ACT, como BFT) ao longo do mesmo período (72h). Não houve diferença significativa no peso corporal final dos animais ($10,36 \text{ g} \pm 0,18$ em BFT; $10,98 \text{ g} \pm 1,28$ em ACT).

Figura 3: Taxa de sobrevivência (%) de *Litopenaeus vannamei* após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).



ACT: água clara tratada. BFT: bioflocos. CTR: grupo controle (camarões não-inoculados com o WSSV, em ACT e em BFT).

c. Quantificação viral por RT-qPCR

A quantificação viral realizada nos camarões 48h p.i., mostrou uma carga viral maior nos animais mantidos em BFT, em relação àqueles mantidos em ACT. Por outro lado, no único camarão infectado que sobreviveu até 72h p.i. em BFT, a carga viral mostrou-se comparativamente menor. Este resultado encontrou paralelo na observação de que este mesmo indivíduo estava entre os poucos sobreviventes sem sinais clínicos visíveis, como alguns dos animais sobreviventes em ACT pelo mesmo período (72h p.i.). Além disso, nenhuma diferença foi observada na carga viral entre 48h e 72h p.i. nos camarões mantidos em ACT (Tabela 2).

Tabela 2: Quantificação viral em camarões, *Litopenaeus vannamei*, determinada através de RT-qPCR, após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). **I** – Carga viral (WSSV) em amostras de pleópodes de camarões mantidos em água clara tratada (ACT) e em bioflocos (BFT), em 48 e 72h pós-infecção. **II** – Carga viral (WSSV) em amostras de água de ACT e BFT e em sedimento de BFT.

I - Carga viral nos camarões		
Tempo (h)	Água clara (μL^{-1})*	Bioflocos (μL^{-1})*
48	$1,0 \times 10^7 - 1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8 - 1,8 \times 10^8$
72	$1,0 \times 10^7 - 2,8 \times 10^7$	$1,0 \times 10^5$

II – Carga viral em amostras de água e sedimento**	
Amostra	(μL^{-1})
Água clara	$7,9 \times 10^4$
Água de bioflocos	$4,6 \times 10^4$
Sedimento de bioflocos	$3,2 \times 10^4$

* O intervalo da carga viral corresponde aos valores determinados, individualmente, para um total de cinco camarões, exceto 72h p.i. no sistema com bioflocos, cujo valor corresponde a carga viral do único indivíduo sobrevivente; ** A carga viral de amostras de água e sedimento foi obtida a partir de amostras agrupadas [100 ml de água / tanque (6 aquários); sedimento em 1L de água / tanque (6 aquários)].

d. Análise do nível de transcritos de genes alvo

Ao compararmos o perfil de transcritos de genes alvo nos tempos pré-infecção (0h) e pós-infecção (48h p.i.), observamos uma diferença significativa entre o nível dos transcritos de camarões infectados experimentalmente, e não infectados.

Alguns dos genes alvo mostraram transcrição diferencial somente em um determinado tecido, como no caso dos genes *β-tubulina*, *Calreticulina*, *proPO1* e *SOD* no hepatopâncreas. Por outro lado, os genes *QM* e *Ubiquitina* foram transcritos diferencialmente em todos os tecidos analisados. De outro modo, os níveis de transcrição de *H1* e *GAPDH* não se mostraram diferentes entre animais infectados e não infectados (Tabela 3).

As diferenças no nível de transcritos entre camarões desafiados e não desafiados com WSSV foram muito maiores no caso de genes que se mostraram induzidos (regulados positivamente).

Além disso, maiores diferenças nos níveis de transcrição foram mais evidentes no hepatopâncreas de camarões mantidos em bioflocos. No geral, os hemócitos não apresentaram alterações notáveis no nível de transcrição dos genes alvo selecionados, após a infecção viral. A tabela 3 resume as observações relativas ao perfil dos transcritos dos genes alvo 48h p.i., tendo sido utilizado o gene que codifica o RNA ribossomal 18S de decápodes (*rRNA 18S*) como gene referência. Os gráficos da Figura 3 mostram, comparativamente, esse mesmo perfil para os diferentes tecidos analisados.

Tabela 3: Níveis de transcrição de genes alvo em brânquias, hemócitos e hepatopâncreas de *Litopenaeus vannamei*, mantidos em bioflocos e água clara, após 48h de desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV). Os números quantificam em número de vezes a diferença na transcrição gênica em relação ao gene referência (*rRNA 18S*).

Sistema / Tecido	Gene						
	<i>β-tubulina</i>		<i>Calreticulina</i>			<i>EF-1α</i>	
	BRQ	HEM	HEP	BRQ	HEM	HEP	
Bioflocos	-	-	↑ 30,3x	-	-	↑ 30,3x	-
Água clara	-	-	↑ 6,1x	-	-	↑ 4,8x	↓ 0,9x
	<i>GAPDH</i>		<i>HI</i>			<i>proPOI</i>	
	BRQ	HEM	HEP	BRQ	HEM	HEP	HEP
Bioflocos	-	-	-	-	-	-	↑ 22,1x
Água clara	-	-	-	-	-	-	-

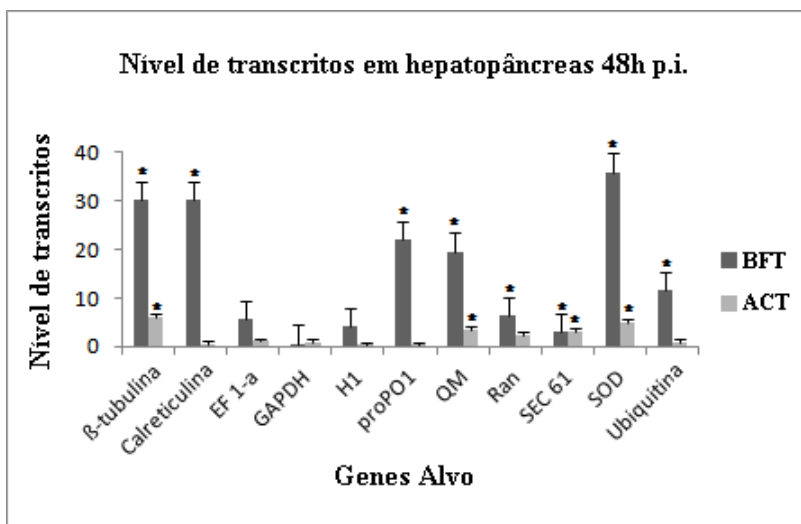
Sistema / Tecido	QM				Ran				SEC 61			
	BRQ	HEM	HEP	HEM	BRQ	HEM	HEP	HEM	BRQ	HEM	HEP	HEM
Bioflocos	↑1,3x	-	↑19,6x	-	↑16,0x	-	↑6,3x	-	-	-	↑3,1x	-
Água clara	↑17,8x	↑21,6x	↑3,4x	-	-	-	-	-	↑15,7x	-	↑3,2x	-

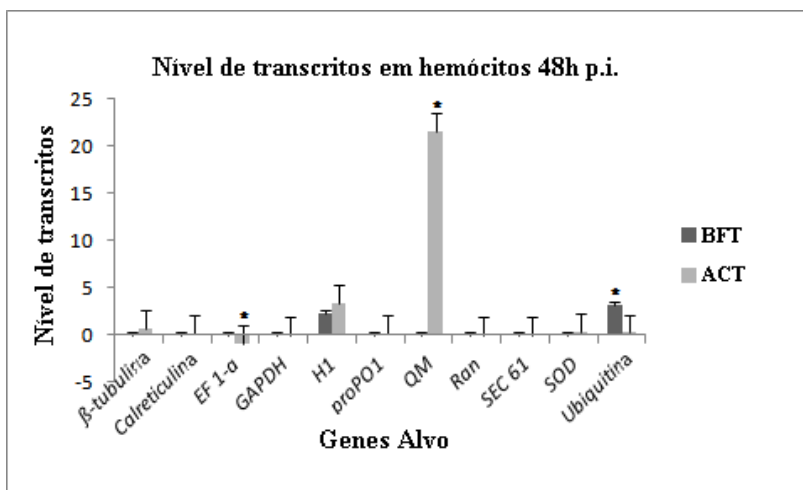
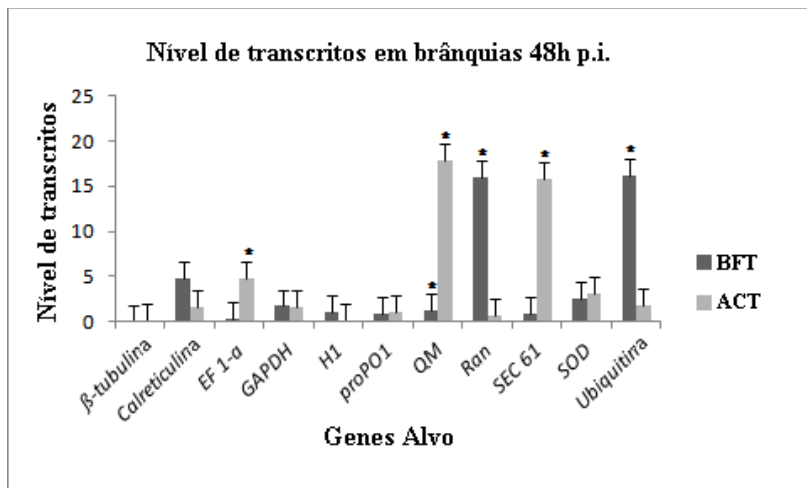
Sistema / Tecido	SOD				Ubiquitina			
	BRQ	HEM	HEP	HEM	BRQ	HEM	HEP	HEM
Bioflocos	-	-	↑36,0x	-	↑16,1x	↑3,1x	↑11,7x	-
Água clara	-	-	↑5,1x	-	-	-	-	-

BRQ: brânquias; HEM: hemócitos; HEP: hepatopâncreas.

Nível de significância: 95%. ↑: regulação positiva significativa; ↓: regulação negativa significativa; -: não houve diferença significativa na regulação gênica.

Figura 4: Gráficos do perfil quantitativo do número de transcritos em diferentes tecidos, i.e., hepatopâncreas, brânquias e hemócitos, após 48h do desafio de *Litopenaeus vannamei* com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).





BFT: bioflocos; ACT: água clara. Quantificação relativa do número de transcritos em relação ao gene rRNA 18S, utilizado como referência. Eixo y indica número de vezes em que o gene foi induzido ou reprimido. Nível de significância: 95%. * diferencialmente transcrito.

4. Discussão

Para melhor entender as respostas moleculares causadas pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV) no camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, bem como avaliar um possível efeito das condições de cultivo, em tais respostas, avaliamos o nível de transcritos de genes alvo em camarões juvenis, experimentalmente infectados pelo vírus, mantidos em água clara (ACT), e em bioflocos (BFT).

Nossos resultados indicaram que os tecidos analisados apresentaram transcrição diferencial, ao se comparar os sistemas ACT e BFT, após a infecção viral. Em um sistema experimental livre de WSSV, a transcrição dos genes alvo mostrou o mesmo perfil, independente de terem sido os camarões mantidos em sistema BFT ou ACT.

No entanto, diferentes condições ambientais e de sistemas de produção poderiam estar modulando as respostas moleculares de forma diferente, refletindo-se em uma sobrevivência diferenciada nos tratamentos. Portanto, quando a infecção viral ocorre, a transcrição de alguns genes é influenciada pelo tipo de sistema. Os animais mantidos em ACT apresentaram maior número de transcrições diferenciais em brânquias. Por outro lado, o hepatopâncreas de animais mantidos no BFT apresentou mais transcritos diferenciais, com ênfase em genes diretamente relacionados à resposta imune e à imunidade antiviral. Poder-se-ia especular que, de modo análogo, outros genes associados ao sistema imunológico, como a profenoloxidase 2 (*proPO2*) e a enzima ativadora da profenoloxidase 1 (*PPAE1*), por exemplo, possivelmente apresentassem uma modulação positiva relacionada às condições ambientais do BFT (Kim et al., 2014). Portanto, o tipo de sistema experimental influencia os níveis de transcrição de genes específicos, porém somente após a infecção pelo WSSV. Mas, por outro lado, este fato não necessariamente vem a ser traduzido diretamente em uma maior sobrevivência, como observamos no presente estudo. Assim sendo, ampliar o perfil dos genes transcritos analisados frente a infecção, considerando os dois sistemas de produção, BFT e ACT, permanece válida.

É essencial ter em mente que os surtos de doenças infecciosas na carcinicultura não ocorrem unicamente devido à presença de um determinado patógeno, sendo, a causa, geralmente, multifatorial. O início, a susceptibilidade, o curso de evolução e o grau da severidade das doenças infecciosas são influenciados por uma grande variedade de

fatores, como condições ambientais, nutrição, genética e fisiologia animal (Cuéllar-Anjel et al., 2014).

Estudos recentes sugerem que o BFT pode contribuir para uma eficaz resposta imune dos animais, além de que o crescimento de camarões neste sistema pode estar relacionado a uma maior sobrevivência, crescimento e expressão de genes do sistema imune (Ekasari et al., 2014; Kim et al., 2014).

Apesar dessas premissas, nós observamos uma maior mortalidade cumulativa entre os animais mantidos em BFT, em comparação com aqueles mantidos em ACT, após o desafio com o WSSV. Nossos resultados podem ser parcialmente atribuídos às condições do desafio viral que estabelecemos, como o uso de uma carga viral moderada (Souza, 2008), com o objetivo de estabelecer uma infecção aguda (72 - 96 h), bem como à virulência do vírus. Os estudos mencionados no parágrafo anterior não incluíram qualquer desafio com agente patogênico, ou, quando realizado, o desafio experimental envolveu um vírus diferente, e.g., o vírus da mionecrose infecciosa (IMNV).

Por outro lado, deve ser levado em consideração que o BFT constitui um ambiente riquíssimo, exibindo um número muito abundante de diversas bactérias e outros micro-organismos. Portanto, seria possível considerar que as respostas de defesa, inclusive aquelas relacionadas ao sistema imune do camarão, estão sendo constantemente estimuladas, talvez sendo mantidas, inclusive, próximo de um provável limiar máximo. Essa situação poderia tanto facilitar o pronto desencadeamento de uma resposta de defesa mais intensa e / ou integrada, como, ao contrário, acarretar certa limitação, ou certa diminuição da capacidade (esgotamento) do sistema de defesa frente a um desafio com um patógeno altamente virulento. Por conseguinte, pode-se especular que, após um desafio imune representado por um patógeno de alta virulência, como o WSSV, o sistema imunológico pode não ser mais tão efetivo na proteção do hospedeiro contra a infecção, ocorrendo então altas mortalidades. Necessário ressaltar que, por ser o BFT um sistema muito dinâmico, outro experimento poderia, potencialmente, apresentar diferenças em relação a algum dos resultados observados. Da mesma forma, outra forma de desafio experimental, tal como via alimentação, poderia levar a uma diferente resposta do sistema de defesa, principalmente pela maior participação da microbiota intestinal.

Em contrapartida, poder-se-ia considerar que camarões mantidos na ACT não estariam enfrentando uma estimulação ininterruptamente tão

constante e/ou intensa das suas respostas moleculares de defesa e, conseqüentemente, estas poderiam estar sujeitas a uma mobilização imediata mais eficiente frente à súbita invasão por um patógeno.

Essa hipótese poderia explicar, pelo menos parcialmente, nossa observação quanto a maior sobrevivência registrada neste grupo experimental. Portanto, de acordo com esta suposição, o BFT pode ser considerado como mais biosseguro por ser um sistema fechado, porém os animais tornam-se mais suscetíveis à infecção por patógenos muito virulentos, caso estes adentrem o sistema. Ademais, por não ocorrer troca de água, o número de partículas virais seria maior do que no sistema com ACT, visto neste último ocorrer troca de água com frequência ou fluxo contínuo.

Esta hipótese também é suportada pela menor carga viral observada nos camarões mantido em ACT 48h p.i., bem como pela maior replicação viral observada nos camarões do BFT 48h p.i. Em outras palavras, poder-se-ia sugerir que, quando confrontados com um patógeno virulento, os camarões mantidos em BFT não conseguem lidar com o desafio apresentado, podendo ser o nível, ou a mobilização da resposta de defesa global, menos intensa ou mais limitadamente coordenada do que aquela requerida frente a esta situação.

Apesar do postulado recente de que os isolados geográficos do WSSV não sofrem mutações frequentes, devido à natureza do seu genoma, o qual é constituído de DNA (Cuéllar-Anjel et al., 2014), diferenças na virulência entre isolados do WSSV já foram relatadas. Rahman e colab. (2008) mostraram que três diferentes isolados geográficos de WSSV, dois da Tailândia e um do Vietnã, diferiram em termos de virulência ao infectar *L. vannamei* juvenil. Os isolados mais virulentos foram os da Tailândia, uma vez que mortalidades foram registradas em 36h p.i., enquanto que para o isolado do Vietnã, mortalidades foram registradas entre 36h e 60h p.i. Com base em nossos dados relativos à primeira mortalidade registrada em 24h p.i. e também à mortalidade acumulada em 48h p.i., podemos considerar nosso isolado como altamente virulento quando nas condições deste trabalho, i.e., em infecção por injeção intramuscular com carga moderada de partícula viral. Por outro lado, diferenças no comportamento relativo à virulência de isolados geográficos do WSSV podem estar relacionadas a variações no genoma viral, como a ocorrência de repetições tipo VNTRs (*Variable Number of Tandem Repeats*) e deleções, como já apontado anteriormente em uma análise comparativa de regiões genômicas-alvo (ORFs - *Open Reading Frames*) entre o isolado viral de Santa Catarina

(SC-WSSV) e outros isolados geográficos de WSSV (Müller et al., 2010).

Com base em nossos resultados relativos à quantificação da carga viral e ao acompanhamento do curso da infecção, observou-se um padrão individual distinto de resposta à infecção. Esta diferença foi evidenciada pelo registro de um único camarão sobrevivente no BFT 72h p.i. Curiosamente, este camarão não apresentou sinais clínicos visíveis. As infecções virais em crustáceos podem ser caracterizadas como persistentes, com carga viral extremamente baixa, após a sobrevivência da fase aguda (Cuéllar-Anjel et al., 2014). Em nosso estudo, o único camarão sobrevivente 72h p.i. no BFT poderia ser considerado como portador assintomático. Cabe salientar que a carga viral deste indivíduo aumentou ao longo do período de 72 h da infecção, porém foi a mais baixa quando comparada à carga viral dos demais animais, independentemente do sistema em que foram mantidos ao longo do experimento, i.e., ACT ou BFT. Portanto, este único sobrevivente no BFT pode ser considerado como um indivíduo menos suscetível à infecção experimental pelo WSSV. Embora não possamos afirmar que este sobrevivente comportar-se-ia como um hospedeiro persistentemente infectado, bem como um portador assintomático, por um período mais longo que 72h p.i., poderíamos especular que, muito provavelmente, isto pudesse vir a ocorrer. Esta observação ressalta a grande importância de não apenas abordar a resposta de defesa do hospedeiro em relação aos agentes patogênicos, mas também utilizá-las para estabelecer um conjunto de marcadores moleculares que possam ser associados à diversidade genética de populações de camarões cultivados e, principalmente, de reprodutores.

Como esperado, uma menor quantidade de partículas virais foi detectada em amostras de água em comparação a amostras de tecido. Recentemente, Kumar e colab. (2013) relataram uma menor quantidade de partículas do WSSV em água residual de tanques, nos quais ocorreu surto da doença da mancha branca, em comparação com a quantidade encontrada no sedimento dos mesmos tanques. Uma vez que o vírus pode permanecer infeccioso na água por um longo período (Kumar et al., 2013), a água de produção, sendo devolvida ao meio ambiente sem tratamento para eliminar essas partículas, pode contribuir para o aparecimento e a persistência da infecção viral. É interessante notar a detecção de partículas virais no sedimento do BTF no presente estudo. Esta observação enfatiza que o vírus pode permanecer no sedimento, representando uma adicional fonte de infecção para sucessivos ciclos de

produção. Em termos de bioseguridade, a transmissão hídrica significa uma ameaça para a saúde animal, especialmente para os animais na fase de muda, quando se tornam ainda mais suscetíveis a serem infectados por esta via (Corteel et al., 2009).

Visando contribuir para o delineamento do perfil molecular associado às estratégias de defesa de *L.vannamei* frente ao WSSV, analisamos o nível de transcritos de genes alvo em camarões mantidos em ACT e BFT, 48h p.i. A seleção dos genes alvo, como potenciais genes responsivos à infecção pelo WSSV, baseada em trabalhos anteriores (Müller, 2009), envolveu genes relacionados ao sistema imune, defesa antioxidante, sinalização celular, apoptose, síntese e degradação de proteínas.

Considerando o estabelecimento e a persistência da infecção pelo WSSV e visando ampliar a análise comparativa, avaliamos as respostas em diferentes tecidos. Curiosamente, observamos poucas diferenças significativas no perfil de transcrição dos genes selecionados em hemócitos, entre camarões desafiados com WSSV e camarões não infectados. Por outro lado, mais diferenças significativas no nível de transcritos entre os genes alvo foram observadas em brânquias e hepatopâncreas. As brânquias estão mais expostas, e em contato constante com a água circundante, enquanto o hepatopâncreas desempenha um indiscutível papel na infecção natural por via oral. Como em outros invertebrados, os hemócitos, integrantes da resposta celular do sistema de defesa imune inato dos crustáceos, atuam na coagulação da hemolinfa, na melanização, no reconhecimento e aglutinação celular, na fagocitose e encapsulamento, além da produção de EROs e nitrogênio e peptídeos antimicrobianos, entre outras ações.

Devemos ponderar a questão do tempo de infecção (48h p.i.) em que realizamos as análises no presente estudo. Duan e colab. (2014) evidenciaram que o perfil de expressão do gene *Calreticulina*, analisado em hemócitos e hepatopâncreas do camarão *Exopalaemon carinicauda*, foi modulado por WSSV e *Vibrio anguillarum*, após 6h e 12h de infecção. No caso do presente estudo, não podemos descartar que a transcrição gênica pode ter sido também alterada/modulada antes mesmo do início da mortalidade.

O WSSV é um vírus envelopado, apresentando um genoma constituído de DNA dupla fita. Replica-se em tecidos de origens ecto e mesodérmicas, tem um amplo espectro de hospedeiros, possuindo um genoma muito estável (Cuéllar-Anjel et al., 2014). Arts e colab. (2007) demonstraram que, em *Penaeus monodon*, em uma infecção por

imersão, após 48h e 72h p.i. um número significativo de núcleos de células branquiais mostraram-se infectados com o WSSV. Ao mesmo tempo, observaram-se mais hemócitos circundantes nas brânquias de animais infectados.

Muitos dos nossos resultados relacionados à transcrição de genes podem ser entendidos como uma consequência direta da ação viral contra a célula hospedeira. Várias são as patologias celulares causadas pela interação vírus-célula. Entre tais, podemos citar a interferência no mecanismo de transcrição gênica, o processamento e transporte de mRNA, a inibição da tradução de mRNA, e a indução da apoptose celular (Murphy et al., 1999; Shekar; Ponniah, 2015).

A morte celular programada é uma resposta contra uma infecção patogênica, sendo um dos processos celulares responsáveis pela morte do camarão durante a infecção pelo WSSV (Flegel, 2007). O vírus é capaz de desencadear a cascata de reações que leva à apoptose da célula hospedeira. Nossos resultados apontam na direção desta estratégia, uma vez que a infecção pelo WSSV provocou um aumento no nível de transcrição de *QM*, em todos os tecidos analisados, bem como no nível de transcrição de *EF-1 α* em brânquias de camarões mantidos em ACT.

Durante uma infecção produtiva, a replicação viral produz novas partículas virais, resultando na liberação da progênie. Houve uma regulação positiva do gene *SEC 61* em brânquias de camarões mantidos em ACT e também em hepatopâncreas de animais de ambos os sistemas, BFT e ACT. Possivelmente, essa modulação positiva foi devido ao aumento na quantidade de proteínas virais na célula; estas utilizaram o complexo proteico transmembrana como canal de transporte para a montagem de partículas virais. Do mesmo modo, o gene *β tubulina*, relacionado a manutenção e reorganização do citoesqueleto, exibiu o mesmo perfil observado no hepatopâncreas.

De acordo com Vidya, Gireesh-Babu e Prasad (2013), o WSSV modifica a ubiquitinação do hospedeiro, redirecionando as proteínas do hospedeiro a fim de favorecer o ciclo de replicação viral. Os vírus podem interferir nos mecanismos celulares, tais como na modificação e direcionamento de proteínas (Murphy et al., 1999). Em nosso estudo, observamos uma maior regulação do gene *Ubiquitina* em todos os tecidos dos camarões mantidos em BFT, indicando que, pelo menos nas condições fornecidas por este sistema, a transcrição do gene *Ubiquitina* do hospedeiro é modulada ou afetada pela infecção por WSSV.

Duan e colab. (2014) observaram diferença significativa no nível de transcrição do gene *Calreticulina* 6h e 12h p.i, quando *Exopalaemon*

carinicauda foi desafiado com *V. anguillarum* e WSSV. Além disso, Gao e colab. (2016), em um estudo de estresse hiposmótico em *L. vannamei*, constataram um aumento na transcrição deste gene em hepatopâncreas e hemócitos, 6h e 12h p.i., respectivamente, seguido de uma diminuição correspondente 24h p.i. Contudo, em intestino e brânquias, a modulação não foi observada. Em nosso estudo, o nível de transcrição de *Calreticulina* mostrou diferença apenas no hepatopâncreas de animais advindos do BFT, 48h p.i.

Diretamente envolvido com a resposta imune e as defesas antioxidantes em camarões, observamos diferentes níveis de transcrição dos genes *proPOI* e *SOD*, respectivamente, em particular no hepatopâncreas, embora no caso de *proPOI* apenas nos camarões dos tanques de BFT. Em *L. vannamei*, foram relatadas diferenças na transcrição de *SOD* ou na atividade de seu produto enzimático correspondente frente a infecção bacteriana. Hsieh e colab. (2008) demonstraram que a atividade da enzima SOD diminuiu 12h após infecção com *Vibrio alginolyticus*. Por outro lado, Chiu e colab. (2007) observaram um resultado oposto, também após o desafio bacteriano, quando os camarões foram alimentados com dieta contendo *Lactobacillus plantarum*. Moser (2011) mostrou que, após a exposição ao piretroide permetrina, a transcrição de *SOD* nas brânquias de *L. vannamei* foi inibida 6h e 12h após a exposição ao pesticida, mas aumentou após 48h e 72h de exposição. Nossos resultados podem ser considerados como indicativos de uma resposta de defesa suscitada no desafio viral, corroborando essa resposta celular como um indicador geral de estresse (Smith et al., 2014). Além disso, nossos resultados poderiam apontar que o processo celular fagocítico do camarão poderia estar mais ativo 48h p.i., refletindo em uma produção mais intensa de ERO. Ademais, estariam em concordância com o relato recente de que 6h p.i., o WSSV neutraliza as defesas do hospedeiro contra o estresse oxidativo (Chen et al., 2016), o que poderia explicar o aumento que observamos no nível dos transcritos de SOD após um maior intervalo p.i.

Também associado à resposta de defesa do hospedeiro contra a infecção por patógenos, o sistema de ativação da profenoloxidase (*proPOI*) reconhece bactérias e fungos (Smith et al., 2014), sendo uma das respostas imunes mais importantes nos crustáceos. Diferentemente dos nossos resultados, Yeh e colab. (2009) mostraram que *L. vannamei* infectados com WSSV, ou com WSSV em co-infecção com IHHNV (vírus da infecção hipodermal e necrose hematopoiética), apresentaram

uma diminuição no nível de transcrição de *proPO*. Dessa forma, os autores sugeriram que uma das causas da mortalidade observada seria a própria infecção pelo WSSV, associada à supressão da transcrição de alguns genes relacionados ao sistema imune, como *proPO*.

De fato, a baixa transcrição gênica, ou mesmo sua ausência, e/ou o nível de atividade do sistema proPO podem ser críticas para uma defesa imune efetiva, resultando em animais mais suscetíveis a infecções secundárias e facilitando a morte por infecção viral. Nossos resultados indicaram que, na maior parte dos tecidos analisados, não houve diferença nos níveis de transcritos de *proPO*, o que pode ser entendido como uma condição imunológica frágil dos animais em ambos os sistemas. Esta evidência também poderia ser corroborada pela ausência de diferença nos transcritos de *H1*, mas, por outro lado, deve-se levar em consideração que cromatina ativa em termos transcricionais possui menos histona H1, além de depender da modificação covalente de outras histonas presentes. Um estudo recente em hemócitos de *L.vannamei* relatou o envolvimento de histonas em armadilhas extracelulares, essenciais para a depuração bacteriana (*Escherichia coli*), semelhante ao observado em vertebrados, não tendo, no entanto, sido observada essa mesma resposta em relação à estimulação das células com WSSV (Ng et al., 2013). Por outro lado, Müller (2009) identificou, entre os genes induzidos de uma biblioteca subtrativa de cDNA obtida a partir de brânquias desta mesma espécie de crustáceo, uma sequência nucleotídica, cujo produto corresponde a uma histona da classe 2. Desta forma, seria interessante ampliar a investigação relativa a transcrição dos genes dessa família de proteínas frente a infecção pelo WSSV.

Como exceção frente ao relatado anteriormente, vale ressaltar o elevado nível de transcrição de *proPO1* em hepatopâncreas de animais infectados, mantidos em BFT. Este grupo também apresentou uma alta transcrição de *SOD*. Embora não tenha sido efetivo para resultar em maior sobrevivência dos camarões neste meio, o conjunto dessas duas respostas é significativo. À medida que a via da proPO resulta em moléculas tóxicas e EROs (Cerenius; Söderhäll, 2004), tornam-se, paralelamente, necessárias algumas estratégias celulares para reduzir as EROs em excesso, como a modulação da transcrição de *SOD*.

Buscando explorar ainda mais as respostas de defesa contra o WSSV, relacionadas à fagocitose, também abordamos o perfil de transcrição do gene *Ran*, relacionado à proteína nuclear Ras. Este gene é descrito como associado à imunidade antiviral do camarão (Han; Zhang, 2007). Han e Zhang (2007) mostraram que sua transcrição foi detectada

em diferentes tecidos, incluindo hepatopâncreas, hemolinfa e brânquias de *Penaeus japonicus* infectados com WSSV; sendo uma regulação positiva observada 4h p.i. Da mesma forma, Qiao e colab. (2015) observaram flutuação nos níveis de transcrição deste mesmo gene ao longo da infecção de *L.vannamei* com WSSV, co-infectado com *V. anguillarum*, 48h p.i. Curiosamente, os autores concluíram que a supressão da transcrição pode estar diretamente relacionada a altas mortalidades. No presente estudo, mesmo tendo sido observada a regulação positiva da transcrição deste gene em brânquias e hepatopâncreas em camarões mantidos em BFT e, provavelmente, um consequente aumento no processo de fagocitose, esta resposta não foi suficiente para evitar a alta mortalidade.

Em resumo, podemos ressaltar que uma estirpe virulenta de WSSV levou a uma infecção aguda em ambos os sistemas de produção, BFT e ACT, embora com maior mortalidade em BFT. De modo interessante, um único camarão aparentemente menos suscetível ao WSSV foi observado no BFT, constituindo uma evidência relevante acerca de diferenças individuais de susceptibilidade, as quais devem ser melhor exploradas.

Por fim, níveis mais elevados de transcrição gênica foram observados em hepatopâncreas de camarões de BFT, seguido das brânquias de animais de ACT. Nos hemócitos, o nível de transcrição dos genes alvo abordados no presente estudo mostrou-se mais afetado pelo desafio viral, independentemente do sistema de produção, BFT ou ACT.

Ademais, mesmo com o atual conhecimento sobre as respostas associadas a RNA de interferência (RNAi), pouco se conhece ainda sobre as defesas antivirais, sua interação com outras vias moleculares e, de modo geral, sobre a modulação das respostas do hospedeiro pelo WSSV.

O BFT não deve ser visto como um tratamento, mas um auxiliar na prevenção de doenças, uma vez que contribui para a biosegurança nos cultivos. Sem medidas de biosegurança, há tendência de maior mortalidade, independentemente do sistema de produção em que os animais são mantidos, além de permitir a permanência e a dispersão mais ampla de um dado patógeno em áreas de cultivos. Mesmo sendo o BFT mais bioseguro justamente por ser um sistema fechado, quando da presença do WSSV, os animais apresentam-se mais vulneráveis.

Apesar de o nosso trabalho ser limitado a camarões juvenis e a um conjunto relativamente restrito de genes alvo 48h p.i., enfatizamos a necessidade de considerar estratégias de manejo e biosegurança,

mesmo em bioflocos, evitando assim a entrada de patógenos e, consequentemente, altas taxas de mortalidade na carcinicultura.

5. Conclusão

Nosso estudo sugere que, embora camarões mantidos em bioflocos (BFT) possam ser, aparentemente, menos vulneráveis às doenças infecciosas, o desafio imunológico causado pelo WSSV pode levar a uma elevada mortalidade, independentemente do sistema de produção em que os animais são produzidos. Vírus altamente virulentos, como o WSSV, interferem na sobrevivência do hospedeiro, através da modulação de diferentes vias celulares, não apenas aquelas diretamente relacionadas à resposta imune inata.

Portanto, são necessários mais estudos para elucidar e preencher as lacunas do conhecimento sobre o impacto da infecção viral, em particular do WSSV, nas respostas de defesa do hospedeiro, bem como nas vias de sinalização envolvidas, além de ampliar a investigação sobre o efeito do BFT sobre o metabolismo e as respostas moleculares frente aos agentes patogênicos.

6. Agradecimentos

Agradecemos ao Laboratório de Camarões Marinhos - LCM (Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil), e à sua equipe, pelo fornecimento dos camarões utilizados neste estudo, bem como do bioflocos, e pelo suporte durante o experimento. Esta pesquisa foi financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq), Brasil, sob o número de concessão Proc. nº. 407211 / 2012-8, para MRFM. À KOO foi concedida uma bolsa iniciação científica PIBIC / CNPq. À CSV foi concedida uma bolsa CAPES do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da UFSC. MRFM é destinatária de uma bolsa de pesquisa de produtividade do CNPq (Proc. nº407211/2012-8; Proc. nº311099/2013-0).

7. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

8. Referências

- Arts J.A., Taverne-Thiele A.J., Savelkoul, H.F., Rombout, J.H. Haemocyte reactions in WSSV immersion infected *Penaeus monodon*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.164-170, 2007.
- Cardona E., Gueguen Y., Magré K., Lorgeoux B., Piquemal D., Pierrat F., Noguier F., Saulnier D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, v.16, p.157-165, 2016.
- Cerenius L., Söderhäll K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, p.116-126, 2004.
- Chen G., Zhang C., Li C., Wang C., Xu Z., Yan P. Haemocyte protein expression profiling of scallop *Chlamys farreri* response to acute viral necrosis virus (AVNV) infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v.35, p.1135-1145, 2011.
- Chen, I-T., Lee, D-Y, Huang, Y-T, Kou, G.H., Wang, H-C., Chang, G-D., Lo, C-F. Six hours after infection, the metabolic changes induced by WSSV neutralize the host's oxidative stress defenses. **Scientific Reports**, v.6, 2016.
- Chiu C.H., Guu Y.K., Liu C.H., Pan T.M., Cheng W. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.364-377, 2007.
- Corteel M., Dantas-Lima J.J., Wille M., Alday-Sanz V., Pensaert M.B., Sorgeloos P., Nauwynck H J. (2009) Molt stage and cuticle damage influence white spot syndrome virus immersion infection in penaeid shrimp. **Veterinary microbiology**, v.137, p.209-216, 2009.
- Cottin D., Shillito B., Chertemps T., Tanguy A., Léger N., Ravaux J. Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. **Marine genomics**, v.3, p.71-78, 2010.

Crab R., Defoirdt T., Bossier P., Verstraete W. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v. 356, p. 351-356, 2012

Cuéllar-Anjel J., Corteel M., Galli L., Alday-Sanz V., Hasson K.W. W. Principal shrimp infectious diseases, diagnosis and management. In: Alday-Sanz, V. (Ed.). **The shrimp book**. Nottingham: Nottingham University Press, p.517-621, 2014.

Cueille N., Blanc C.T., Riederer I.M., Riederer B.M. Microtubule-associated protein 1B binds glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Proteome Research**, v.6, n.7, p.2640-2647, 2007.

Dhar A.K., Bowers R.M., Licon K.S., Veazey G., Read B. Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. **Molecular Immunology**, v. 46, n. 8, p. 1688-1695, 2009.

Duan Y., Liu P., Li J., Wang Y., Li J., Chen P. Molecular responses of calreticulin gene to *Vibrio anguillarum* and WSSV challenge in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.36, n.1, p.164-171, 2014.

Ekasari J., Azhar M.H., Surawidjaja E.H., Nuryat S., De Schryver P., Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental & Comparative Immunology**, v.31, n.3, p.217-231, 2007.

Flegel T. W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental & Comparative Immunology**, v.31, n.3, p.217-231, 2007.

Gao W., Tian L., Huang T., Yao M., Xu Q., Guo T.L. Molecular cloning and expression of the calreticulin gene of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in response to acute hypo-osmotic stress. **Aquaculture**, v.454, p.265-271, 2016.

Han F., Zhang X. Characterization of a ras-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity. **Fish & shellfish immunology**, v.23, p.937-944, 2007.

Hauton C. The scope of the crustacean immune system for disease control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, n.2, p.251-260, 2012.

Henry T., Gorvel J.-P., Méresse S. Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. **Cellular Microbiology**, v.8, p. 23–32, 2006.

Hsieh S.L., Ruan Y.H., Li Y.C., Hsieh P.S., Hu C.H., Kuo C.M. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. **Aquaculture**, v.275, p.335-341, 2008.

Jung H., Lyons R.E., Hurwood D.A., Mather P.B. Genes and growth performance in crustacean species: a review of relevant genomic studies in crustaceans and other taxa. **Reviews in Aquaculture**, v.5, n.2, p.77-110, 2013.

Kim S.K., Pang Z., Seo H.C., Cho Y.R., Samocha T., Jang I.K. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**, v.45, n.2, p.362-371, 2014.

Kumar, S.S., Bharathi, R.A., Rajan, J.J.S., Alavandi, S.V., Poonima, M., Balasubramanian, C.P., Ponniah, A.G. Viability of white spot syndrome virus (WSSV) in sediment during sun-drying (drainable pond) and under non-drainable pond conditions indicated by infectivity to shrimp. **Aquaculture**, v.401, p.119-126, 2013.

Lightner D.V., Redman R.M., Pantoja C.R., Tang K.F.J., Noble B.L., Schofield P., Mohnney L.L., Nuna L.M., Navarro S.A. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, n.2, p.174-183, 2012.

Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

Lo C.F., Leu J.H., Ho C.H., Chen C.H., Peng S.E., Chen Y.T., Chou C.M., Yeh P.Y., Huang C.J., Chou H.Y., Wang C.H., Ou G.H. Detection of baculovirus associated with White spot syndrome (WSBV) in penaeid shrimps using polymerase chain reaction. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.25, p.133-141, 1996.

Maciel, M.L.T. **Contribuição para o desenvolvimento de uma proposta de monitoramento e certificação sanitária em cultivo de camarão marinho no Estado de Santa Catarina.** 2002. 38f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

Moser J.R. **Biomarcadores moleculares no camarão branco, *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda), submetido a estresse ambiental e infectado pelo vírus da síndrome da mancha branca (White Spot Syndrome Virus, WSSV).** 2011. 93f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

Müller I.C. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus.** 2009. 150f. Ph.D. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

Müller I.C., Andrade T.P., Tang-Nelson K.F., Marques M.R., Lightner D.V. Genotyping of white spot syndrome virus (WSSV) geographical isolates from Brazil and comparison to other isolates from the Americas. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.88, p.91-98, 2010.

Murphy F.A., Gibbs E.P. J., Horzinek M.C., Studdert M.J. **Veterinary Virology.** 3.ed. USA: Academic press, 1999.

Ng T.H., Chang S.H., Wu M.H., Wang H.C. Shrimp hemocytes release extracellular traps that kill bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v.41, p.644-651, 2013.

Qiao G., Xu D.H., Wang Z., Jang I.K., Qi Z., Zhang M., Kim, S.K. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, p.257-264, 2015.

Rahman M.M., Corteel M., Escobedo-Bonilla C.M., Wille M., Alday-Sanz V., Pensaert M.B., Sorgeloos H.J., Nauwynck H.J. Virulence of white spot syndrome virus (WSSV) isolates may be correlated with the degree of replication in gills of *Penaeus vannamei* juveniles. **Diseases of aquatic organisms**, v.79, n.3, p.191-198, 2008.

Rivera I.N., Lipp E.K., Gil A., Choopun N., Huq A., Colwell R.R. Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. **Environmental Microbiology**, v.5, n.7, p.599-606, 2003.

Shekahr, M.S.; Ponniah, A.G. Recent insights into host-pathogen interaction in white spot syndrome virus infected penaeid shrimp. **Journal of Fish Disease**, n.38, v.7, p.599-612, 2015.

Smith V.J., Roulston C., Dyrinda E. The shrimp immune system. In: Alday-Sanz, V. (Ed.). **The shrimp book**. Nottingham: Nottingham University Press, p.89-148, 2014.

Souza T.M. **Deteção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos moleculares de diagnóstico: hibridização *in situ* e PCR em tempo real**. 2008. 46f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

Valentim-Neto, P.A., Fraga, A.P.M., Marques, M.R.F. Differential expression of proteins in the gills of *Litopenaeus vannamei* infected with white spot syndrome virus. **Aquaculture International**, v.22, p.1605-1620, 2014.

Vidya R., Gireesh-Babu P., Prasad K.P. White spot syndrome virus manipulates ubiquitin gene expression in *Penaeus monodon*. **Indian Journal of Virology**, v.24, n.1, p.82-84, 2013.

Wang Y.C., Chang P.S., Chen H.Y. Tissue expressions of nine genes important to immune defense of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p1161-1177, 2007.

Xu J., Wu S., Zhang X. Novel Function of QM protein of shrimp (*Penaeus japonicus*) in regulation of phenol oxidase activity by interaction with hemocyanin. **Cell Physiology and Biochemistry**, v.21, p.473-480, 2008.

Yeh S.P., Chen Y.N., Hsieh S.L., Cheng W., Liu C.H. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish & Shellfish Immunology**, v.26, p.582-588, 2009.

CAPÍTULO 2

Microbiota intestinal em camarões (*Litopenaeus vannamei*) infectados por WSSV, sob dois diferentes sistemas de produção.

Cecília de Souza Valente¹, Ana Rodiles², Daniel Lee Merrifield² & Maria Risoleta Freire Marques^{1*}

¹Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil

²School of Biological & Marine Sciences, Faculty of Science & Engineering, Plymouth University, Plymouth, Reino Unido.

*Autor para correspondência: MRF Marques, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil, CEP 88040-900. E-mail: risoleta.marques@ufsc.br

Resumo

Um dos maiores desafios da carcinicultura é a síndrome da mancha branca, causada pelo vírus homônimo (WSSV). O WSSV é o patógeno mais virulento para camarões de cultivo, levando a altas mortalidades e grandes perdas na produção. Neste contexto, uma microbiota intestinal equilibrada é de fundamental importância, pois atua como um recurso biológico de combate a patógenos, inclusive aqueles considerados como oportunistas, além de estimular o sistema imune. A microbiota da água circundante é igualmente relevante, especialmente a composição microbiana do biofilme. Por ser rico e diversificado em microrganismos, alguns autores classificam-no como um probiótico natural. Em nosso estudo, descrevemos a composição da microbiota intestinal e da água circundante (biofilmes e água clara tratada), antes e 48 horas após infecção experimental (48h p.i.) com WSSV, por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA. Nossos resultados mostram que (i) o WSSV levou a uma perda de heterogeneidade da microbiota intestinal dos animais mantidos em água clara, em nível de gênero; (ii) houve prevalência dos gêneros *Cetobacterium* e *Bacillus* nos intestinos de camarões de ambos os sistemas; (iii) o WSSV não causou alterações de diversidade ou riqueza da microbiota intestinal; (iv) independentemente

do tipo de sistema e do período de 48h p.i., não houve semelhança entre a composição da microbiota intestinal e a da água, apesar daquela ser influenciada pelo tipo de sistema. Portanto, o WSSV é suficientemente virulento para causar altas mortalidades mesmo em sistemas bem manejados, envolvendo bioflocos e independente de mudanças drásticas na microbiota intestinal do hospedeiro.

Palavras-chave: 16S rRNA, bioflocos, microbiota, NGS, *Litopenaeus vannamei*, WSSV.

1. Introdução

Concebido pelo Prêmio Nobel Joshua Lederberg, o termo microbioma é entendido como o material genético e grupo ecológico de micro-organismos comensais, simbióticos e patogênicos em um determinado local, como, por exemplo, em diferentes órgãos de animais, e que podem afetar o equilíbrio entre saúde e doença (Lederberg; McCray, 2001). Assim sendo, a microbiota representa o conjunto de micro-organismos em si. O microbioma pode interferir ou modelar as condições homeostáticas, desempenhando um papel importante no sistema imunológico, e influenciando as interações medicamentosas (Grice; Segre, 2012). Recentemente, a relação entre micro-organismos e seu hospedeiro passou a ser considerada como sendo de tal importância que, em medicina humana, o termo "segundo genoma" já é usual (Zhu; Wang; Li, 2010; Marx, 2012), em referência ao genoma dos micro-organismos no corpo humano.

No contexto da aquicultura, algumas pesquisas recentes têm buscado descrever a flora microbiana da água e do intestino dos animais cultivados. Diferentemente da microbiota de mamíferos, para a qual os principais fatores que influenciam sua composição são a constituição da dieta, a morfologia do hospedeiro e sua filogenia, em animais aquáticos não mamíferos, a microbiota é influenciada principalmente pela anatomia e fisiologia, disponibilidade de alimentos e sistema imunológico (Kostic et al., 2013). No entanto, a correlação direta entre um dado organismo e sua microbiota não é tão pontual, muitas vezes dependendo de fatores diversos, sendo ainda a interação biológica entre microbiota e hospedeiro bastante complexa.

Em peixe-zebra (*Danio rerio*), as classes de bactérias dominantes no intestino são γ -Proteobacteria e Fusobacteria, independentemente da

distância parental ou geográfica, sejam animais em seu habitat natural ou de laboratório (Roeselers et al., 2011). No camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, a microbiota intestinal é influenciada pela idade dos animais, bem como pela alimentação (Huang et al., 2014). Além disso, no camarão tigre-gigante, *Penaeus monodon*, a maturidade da microbiota em seu trato digestivo pode contribuir para a prevenção de doenças, conforme sugerido por Rungrassame e colab. (2016). Adicionalmente, Cardona e colab. (2016) confirmaram a influência da microbiota da água circundante na microbiota intestinal do camarão azul, *Litopenaeus stylirostris*, em um sistema com bioflocos, enfatizando a importância da tríade: ambiente *versus* microbiota *versus* hospedeiro.

A tecnologia de bioflocos (BFT) é um sistema aquícola de produção intensiva, com uma abordagem ecológica, onde a troca de água é limitada ou mesmo ausente. A aeração forte e contínua da água permite a formação dos bioflocos. O BFT é composto por bactérias e outros organismos, além de matéria orgânica e inorgânica. As bactérias heterotróficas, através do uso de energia química da matéria orgânica (compostos nitrogenados assimilados por bactérias) podem controlar a qualidade da água. Os micro-organismos também podem ser ingeridos pelos animais como fonte adicional de proteína, reduzindo o índice de conversão alimentar e criando um ciclo onde os nutrientes podem ser reciclados e reutilizados (Crab et al., 2012; Emerenciano, 2017).

As doenças em animais invertebrados aquáticos são, em alguns aspectos, semelhantes às que afetam animais vertebrados e terrestres. As doenças podem ser causadas por vírus (Yan et al., 2016), bactérias (Crab et al., 2010; Rungrassame et al., 2016), fungos (Gonçalves et al., 2014; Karthikeyan et al., 2015) e parasitas (Tang et al., 2015), além das doenças não-infecciosas (Noga et al., 2006). No entanto, são as doenças infecciosas o fator mais limitante para o avanço da aquicultura. Para os camarões marinhos, especialmente os peneídeos, as infecções virais são o principal desafio para sua produção, levando a impactos negativos significativos na carcinicultura mundial (Lightner et al., 2012). Devido à alta intensificação da aquicultura, ao tráfego cruzado e às correntes oceânicas, os micro-organismos patogênicos podem se espalhar muito rapidamente, causando impactos econômicos, como alta mortalidade ou queda na comercialização.

Causada pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV), a doença da mancha branca (WSD) leva a enormes perdas econômicas. Nos piores anos, os aquicultores contabilizam significativa redução na

produção (Lafferty et al., 2015). Apresentando uma gama relativamente ampla de hospedeiros, o WSSV já foi detectado em diferentes crustáceos aquáticos (Costa et al., 2012; Lightner et al., 2012; Marques et al., 2011). Os animais podem infectar-se por contato direto com animais infectados, principalmente via canibalismo, ou através de água contaminada. A propagação viral é ainda maior se considerarmos a transmissão pelo transporte de animais vivos ou como *commodity*. Como consequência, a doença já foi descrita em quase todas as regiões produtoras, desde Ásia, Oriente Médio, Américas (OIE, 2016), e, mais recentemente, na Austrália (Australian Government, Department of Agriculture and Water Resourcer, 2017).

Sabe-se que a microbiota intestinal pode ser modulada por uma infecção viral. Um estudo realizado por Ding e colab. (2017) com o caranguejo *Eriocheir sinensis* infectado com WSSV indicou alterações na microbiota intestinal ao longo da infecção. No mesmo estudo, os autores também apontaram uma quantidade crescente de bactérias oportunistas e uma diminuição de potenciais probióticos.

Notavelmente, estudos bastante recentes investigaram o efeito potencial de micro-organismos comensais sobre infecções de vírus entéricos no trato intestinal em humanos. Algumas evidências indicaram a facilitação da infecção viral, através da estabilização da partícula viral por meio da sua interação com a superfície das bactérias (Karst, 2016). Considerando que, afora os vírus marinhos que as superam, as bactérias heterotróficas representam os organismos mais abundantes nos oceanos, sua presença pode de fato contribuir para a dinâmica complexa da infecção viral em um dado hospedeiro.

Neste contexto, os objetivos do presente estudo foram caracterizar a microbiota intestinal do camarão *L. vannamei*, em termos de sua composição e diversidade, e avaliar o efeito da infecção pelo WSSV sobre a sua dinâmica, em dois sistemas de produção distintos, água clara (ACT) e bioflocos (BFT).

2. Material e Métodos

a. Espécimes e desenho experimental

Os camarões foram cedidos pelo Laboratório de Camarões Marinhos, Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/CCA/LCM); o referido laboratório emprega adequadas

práticas de manejo sanitário. Os animais provieram de um sistema de produção com bioflocos maduro, estando em bioflocos desde o berçário. Um total de 168 espécimes juvenis de *Litopenaeus vannamei* com $8,0 \pm 1,0$ gramas foram coletados aleatoriamente e aclimatados por um período de quinze dias: 84 animais em um sistema BTF maduro, enquanto 84 em água clara tratada (ACT). A aclimação dos camarões em ACT foi realizada em um tanque de 5000 L, com um sistema de fluxo contínuo de água do mar filtrada e tratada com luz UV, sob aeração constante. A água do mar utilizada era bombeada da praia da Barra da Lagoa, Florianópolis, Brasil. Os camarões no sistema BFT foram mantidos em um tanque com capacidade de 1000 L, nas condições preconizadas para esse sistema, ou seja, sem renovação de água e com aeração forte e constante por Aero-Tube™ central. Este tanque foi coberto com uma rede escura a fim de criar sombreamento, limitando assim a incidência de luz solar e evitando que os camarões saltassem do tanque.

Durante o período de aclimação, todos os camarões foram alimentados diariamente com ração comercial (Guabi® Potimar 35 EXT). A alimentação foi calculada para 3% da biomassa, dividida três vezes ao dia.

A qualidade da água em ambos os sistemas foi avaliada duas vezes ao dia para temperatura e oxigênio dissolvido, assim como duas vezes por semana para pH, amônia, nitrito, nitrato, fosfato, salinidade, alcalinidade, turbidez e sólidos suspensos totais. Caso a alcalinidade apresentasse valor inferior a 120 mg.L^{-1} , era adicionada cal hidratada [Ca(OH)_2], na proporção de 20% a 30% da alimentação. Semelhantemente, quando a gravimetria revelasse valor superior a 600 mg.L^{-1} , ou a determinação pelo cone de sedimentação Imhoff resultasse em volume superior a 4 mg.L^{-1} , removiam-se os sólidos suspensos totais por decantadores.

Ao final de quinze dias, os animais de cada sistema foram distribuídos aleatoriamente em tanques menores (unidades experimentais), conforme detalhado no item 2b.

- b. Infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV)

Após quinze dias, os animais ($10 \pm 1,2 \text{ g}$) foram distribuídos aleatoriamente em quatorze aquários de 25 L cada (480 animais/m^3),

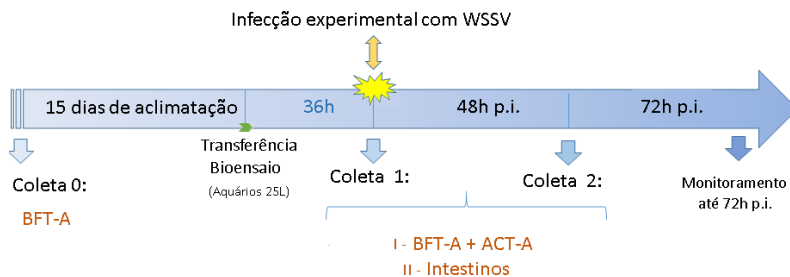
contendo ACT ou BTF, de acordo com sua condição original de aclimatação (n = 12 camarões por aquário).

Após um período 36h nos novos aquários, 96 camarões foram individualmente infectados com um inóculo de WSSV ($5,3 \times 10^4$ vírus. $\text{ml}^{-1}/\text{animal}$), preparado conforme descrito por Valentim-Neto e colab. (2014). Os camarões foram inoculados através de uma injeção intramuscular com 100 μl do inóculo, no terceiro segmento abdominal da região dorsal, utilizando uma seringa estéril de 1 ml. Como grupo controle para cada sistema (ACT e BTF), camarões (n = 8 / sistema) foram injetados da mesma forma e com igual volume, porém com solução salina marinha estéril.

A sobrevivência dos camarões foi monitorada até 72h após a infecção. Ao longo deste período, foram ainda monitoradas possíveis mudanças de comportamento, coloração corporal, consumo de ração e, eventualmente, sinais clínicos visíveis externos.

O esquema na Figura 1 mostra a representação esquemática do desafio experimental com o WSSV.

Figura 1: Linha do tempo representativa do desenho experimental utilizado para o desafio dos camarões *Litopenaeus vannamei* com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).



BFT-A: água do tanque de bioflocos. ACT-A: água do tanque de água clara.

c. Amostragem

Para análise do microbioma intestinal, um camarão foi aleatoriamente coletado de cada um dos tanques de tratamento, perfazendo um total de cinco camarões por tratamento (n=5/tratamento):

pré-infecção e pós-infecção; BFT e CSW. Os camarões coletados foram submetidos a uma anestesia térmica por hipotermia em banho de gelo dez minutos. Antes da amostragem, a superfície corporal do animal foi desinfetada com etanol 70%. Os intestinos (mucosa e conteúdo intestinal) foram coletados individualmente com tesoura e pinças esterilizadas, em condições assépticas. O tecido foi imediatamente armazenado em microtubo estéril de 1,5 mL e transportado até o laboratório em nitrogênio líquido, onde foi armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, as amostras de intestino foram fixadas em etanol 95% para serem transportadas para a Universidade de Plymouth, Reino Unido, onde se procederam as análises.

A água de BFT foi coletada em três momentos: antes da aclimação, antes do desafio viral e 48h p.i. Foi coletado um volume final de 1000 ml por tanque, composto a partir de amostragem aleatória de volumes menores. Em seguida, um volume igual a 100 ml foi filtrado, através de uma membrana filtrante de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Millipore®) e armazenados em um freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Devido à alta renovação diária da ACT (sistema de renovação contínua), a coleta, neste caso, foi realizada em dois momentos distintos: antes da infecção viral e 48h p.i. Foi coletado um volume final de 1000 ml por tanque, composto conforme descrito acima. A água coletada foi mantida em gelo, sendo imediatamente transportada para o laboratório. A amostra foi também imediatamente filtrada e, em seguida, armazenada nas mesmas condições das amostras provenientes do sistema BFT.

As amostras imobilizadas nas membranas filtrantes foram transportadas a baixa temperatura, em caixa térmica apropriada e resfriada, para a Universidade de Plymouth, Reino Unido, onde se procederam as análises.

d. Extração de DNA e amplificação do gene RNA ribossomal 16S (gene 16S rRNA)

O DNA bacteriano foi extraído a partir de 20 amostras de intestino ($70,15\text{ mg} \pm 8,49\text{ mg}$) de *L.vannamei* e de cinco amostras de água/tanque. Para a extração foi utilizado o QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen®), seguindo as instruções do fabricante. A incubação inicial com 50 mg. ml^{-1} de lisozima foi seguida de uma incubação adicional a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30min, a fim de aumentar a lise de bactérias Gram-positivas. Para avaliar o grau de pureza do DNA extraído, a relação dos valores de

absorbância a 260/280nm e 260/230nm foram determinadas, usando-se um espectrofotômetro UV (Nanodrop 2000, ThermoFischer Scientific®).

A amplificação do gene alvo, gene do RNA ribossomal 16S (16S rRNA), foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), tendo-se como alvo a sequência entre as regiões V1-V2, utilizando o DNA extraído na concentração de 1 ng.µl⁻¹. Para a reação de amplificação foram utilizados o iniciador 27F (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'), e um *pool* dos iniciadores 338R-I (5' GCSW GCC TCC CGT AGG AGT 3') e 338R-II (5' GCSW GCC ACC CGT AGG TGT 3') (Gajardo et al., 2016). Os parâmetros para a *touchdown*-PCR foram os seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 7min; 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30s, anelamento em temperatura decrescente de 63 °C a 53 °C por 30s, diminuindo 1°C por ciclo, extensão a 72 °C por 30s; seguido de 25 ciclos a 94 °C por 30s, 53 C por 30s e 72 °C por 30s, e extensão final a 72 °C por 10min. A reação de *touchdown*-PCR foi realizada com 25 µL de MyTaq™ Red MiX (Bioline®), 1 µL de cada iniciador (25 pM), 3 µL de DNA molde e água para biologia molecular ultrapura para 50 µL de volume final de reação. Foram incluídos controles negativos (água para biologia molecular ultrapura) e positivos (DNA de *Escherichia coli*) em cada reação de PCR.

O tamanho do fragmento esperado (350 pb) foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1,5%. Em seguida, os produtos de PCR, em duplicata, foram agrupados e purificados usando-se a técnica de imobilização reversível em fase sólida, com tecnologia baseada na separação por partículas magnéticas, Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter®). Por fim, o DNA amplificado e purificado foi enviado para Sequenciamento de Nova Geração (NGS), no Laboratório de Genômica, Centro de Biologia, Plymouth University, Reino Unido, empregando o sistema Ion Torrent™ Personal Genome Machine™ (PGM) (ThermoFischer Scientific®).

e. Análise dos resultados do Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Primeiramente, os fragmentos sequenciados foram triados em termos de qualidade, removendo-se iniciadores, enzimas e *barcodes* (Q <20), usando a ferramenta FASTX-Toolkit (Hannon Lab). Em seguida, os dados foram analisados usando o programa Qiime 1.8.0, através do

qual as Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foram classificadas, sendo selecionadas aquelas com similaridade acima de 97%. A afiliação taxonômica foi determinada usando-se a base de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) com limite de confiança de 0,8; o alinhamento múltiplo foi realizado pelo método PyNAST, utilizando-se como critério uma correspondência mínima de 150 pb. A tabela de OTUs gerada foi utilizada para a análise LefSe (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/lefse/>), a fim de se determinar táxons diferenciais entre tratamentos, em diferentes níveis. Para estimar a riqueza e a diversidade bacteriana em todos os tratamentos, foi feita uma análise de rarefação α , utilizando os índices Cobertura de Sequenciamento, Chao1 e Shannon, seguidos pelo teste t de student. A rarefação β foi utilizada para estimar semelhanças ou diversidades em termos de composição das espécies. As sequências foram agrupadas usando a distância UniFrac ponderada e não ponderada, e as semelhanças na distribuição da microbiota entre os tratamentos foram analisadas através da Análise de Coordenadas Principais (PcoA). Os diagramas de Venn foram projetados para determinar as OTUs bacterianas únicas e aquelas compartilhadas entre diferentes tratamentos, através do programa InteractiVenn (www.interactivenn.net, Heberle et al., 2015). As diferenças de Filo e gênero bacterianos entre diferentes tratamentos foram verificados através de ANOVA unidirecional e teste Tukey pós-hoc, sendo adotado nível de significância 5%.

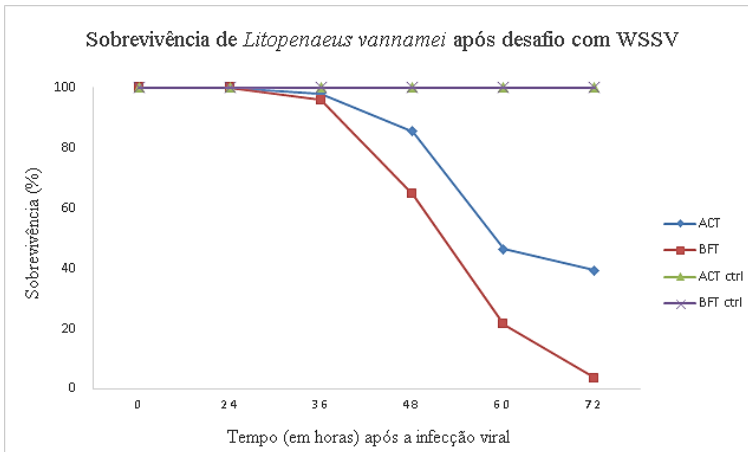
3. Resultados

a. Sobrevivência de *Litopenaeus vannamei* frente ao desafio viral com WSSV

A sobrevivência foi monitorada em todos os grupos experimentais até 72h p.i., quando os camarões sobreviventes foram eutanasiados. As primeiras mortalidades foram registradas 24h após o desafio viral, tendo sido o percentual mais elevado de mortalidade observado entre 48h e 60h p.i. Ao final do experimento, i.e., 72h p.i., apenas 39% dos animais da ACT, e 4% dos animais do BFT permaneceram vivos (Figura 2). Entre os camarões desafiados com o WSSV, alterações no comportamento e/ou sinais clínicos externos visíveis de infecção foram observados, tais como, redução no consumo de ração à inapetência,

letargia, alteração da coloração corporal usual, e canibalismo. De modo geral, prostração no fundo do tanque e ausência de locomoção/movimento natatório representaram o comportamento que precedeu a morte dos animais. Nenhuma morte foi registrada entre os animais nos grupos de controle, seja em ACT, ou em BFT.

Figura 2: Taxa de sobrevivência (%) de *Litopenaeus vannamei* após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca.



ACT: água clara tratada. BFT: bioflocos. CTRL: grupo controle (camarões não-inoculados com o vírus, em ACT e em BFT).

b. Sequenciamento de Nova Geração (NGS): limpeza, filtragem e alinhamento das sequências obtidas

O perfil da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* juvenis foi analisado com base em uma sequência alvo do gene rRNA 16S, como descrito anteriormente em Material e Métodos, através de sequenciamento de nova geração (NGS). As análises foram realizadas, antes e após desafio com WSSV, em indivíduos provenientes de dois sistemas experimentais distintos: bioflocos (BFT) e água clara tratada (ACT). Foi analisada, ainda, a microbiota presente na água do sistema ACT (ACT-A) e na água do sistema BFT (BFT-A).

Os dados de sequenciamento NGS do gene 16S rRNA resultaram em um total de 2.309.089 sequências brutas. Após limpeza e filtragem das sequências, 1.489.963 delas foram qualificadas como de alta qualidade. Um resumo da análise dos dados de NGS é mostrado na Tabela 1. Entre as amostras de intestino, o número de *reads* (leituras) dos animais infectados com WSSV, provenientes da ACT (ACT pré), foi significativamente maior, quando comparado com o número de *reads* em ambos os sistemas, após a infecção viral (ACT pós e BFT pós). Em termos numéricos, o número de *reads* diminuiu após a infecção viral. Entre as amostras de água, não houve diferença entre sistemas, tão pouco em relação à infecção, apesar de o número de *reads* ser maior em BFT-A inicial, mas sem significância estatística. Aparentemente não houve variabilidade no número de *reads* nas amostras de água tanto entre sistemas quanto frente à infecção. Portanto, o perfil do sequenciamento diferiu entre amostras de intestino e amostras de água.

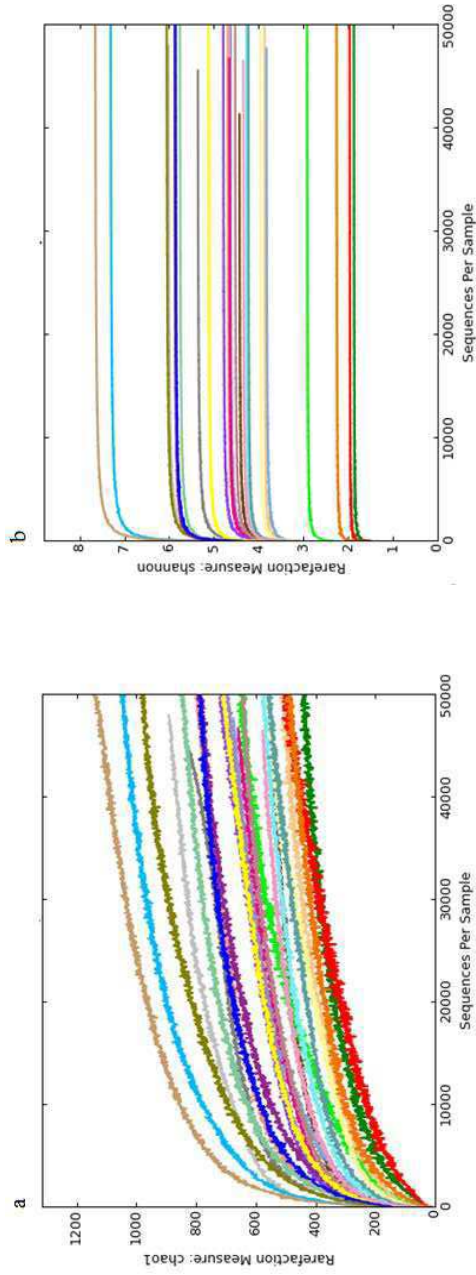
A cobertura de sequenciamento, considerando-se todas as amostras, foi superior a 99% (entre 99,69 e 99, 81%), indicando que o sequenciamento do gene 16R rRNA forneceu uma base sólida para o alinhamento dos *reads*, de modo a permitir a identificação da maioria das bactérias presentes nas amostras. Os índices de rarefação α Chao1 e Shannon foram utilizados para comparar diferenças entre os perfis das microbiotas, em termos de riqueza e diversidade, respectivamente. As curvas de rarefação (Figura 3) atingiram seu patamar de saturação, indicando que foi possível determinar a riqueza bacteriana das amostras, bem como que a maior parte da diversidade microbiana nela presentes foi obtida. Embora com altos índices α identificados, especialmente na água de BFT, após o teste t de student, a única diferença observada foi no índice Chao1, entre BFT pré e água de BFT (BFT-A) pré-infecção. No entanto, essa comparação não foi considerada confiável, uma vez que o total de amostras de BFT-A pré-infecção não fez o número necessário de repetições para que o teste estatístico pudesse ser considerado suficientemente robusto. Consideramos, então, que todos os grupos experimentais apresentaram a mesma riqueza, bem como a mesma diversidade.

Tabela 1: Resumo da análise dos dados obtidos a partir do sequenciamento de nova geração (NGS) em amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei* e amostras de água dos aquários de água clara e bioflocos, antes e após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca WSSV.

	Amostras de intestino				Amostra de água				
	ACT pré	ACT pós	BFT pré	BFT pós	ACT-A pré	ACT-A pós	BFT-A inicial	BFT-A pré	BFT-A pós
Médias de reads após limpeza	74,29 ^a	53,17 ^b	60,67 ^{ab}	51,84 ^b	57,48	55,30	56,78	61,68	58,73
OTUs (>97%)	479	486	558	595	587	537	900	993	822
Filo	13	15	17	19	13	12	16	17	17
Classe	29	29	32	33	21	21	33	30	32
Ordem	44	45	50	48	30	37	42	43	39
Família	80	78	94	86	59	63	67	65	68
Gênero	101	95	105	110	77	72	71	93	79
Índices									
Chao 1	571,56	574,90	665,26	703,42	752,15	648,01	1063,03	1093,89	995,29
Cobertura	99,81%	99,80%	99,76%	99,77%	99,71%	99,73%	99,69%	99,80%	99,79%
Shannon	3,56	4,47	4,12	5,00	4,78	4,52	7,03	7,64	6,05

ACT: amostras de intestino de camarões mantidos em água clara; BFT: amostras de intestino de camarões mantidos em bioflocos; ACT-A: amostras de água dos aquários de água clara tratada; BFT-A: amostras de água dos aquários de bioflocos; BFT-A inicial: amostras de água de bioflocos dos tanques iniciais, antes do período de aclimação; Pré: pré-infecção; Pós: pós-infecção com WSSV; OTUs: *Operational Taxonomic Units*. Diferentes letras indicam diferenças significativas (ANOVA, seguida do teste post-hoc de Tukey, $p < 0,05$).

Figura 3: Curvas de rarefação para as bibliotecas 16S rRNA bacterianas. Em **a** – Curvas que indicam a riqueza de espécies (Curvas do índice Chao1). Em **b**- Curvas que indicam diversidade de espécies (Curvas do índice Shannon).

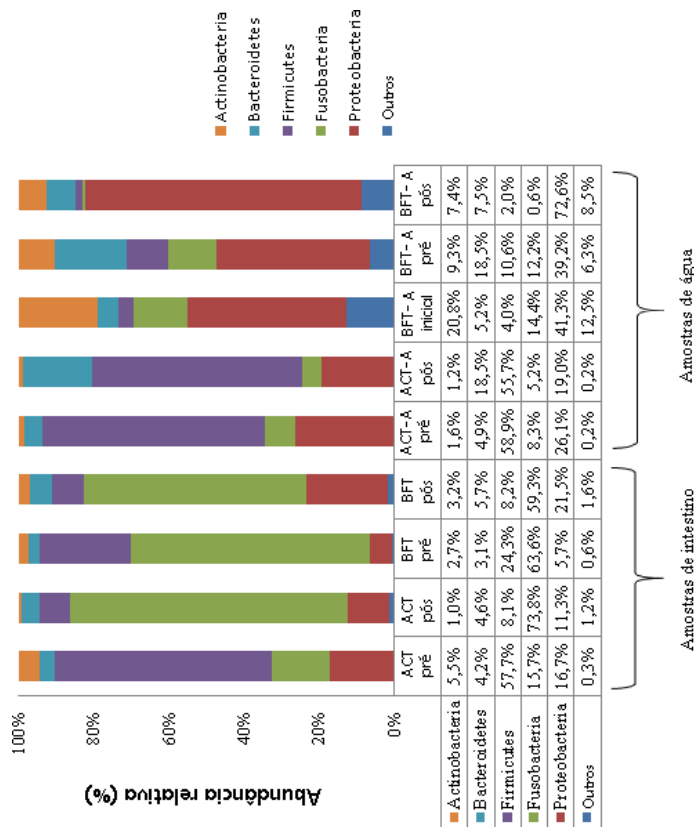


c. Abundância relativa em nível de Filo da comunidade microbiana de amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante

Na microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei*, 98% dos *reads* foram agrupados como pertencentes a cinco Filos, independentemente das condições experimentais. Entre estes, os dois Filos mais prevalentes foram Firmicutes e Fusobacteria. Diferença entre os tratamentos foi observada apenas em relação ao Filo Fusobacteria, em amostras intestinais de camarão mantidos em ACT, antes da infecção por WSSV, ou seja, Fusobacteria se mostrou presente em menor quantidade neste tratamento. Nenhuma diferença foi observada em intestinos de animais mantidos no BFT. Apesar de termos notado porcentagens diferentes na abundância relativa do Filo Firmicutes, não houve diferença estatística entre os tratamentos.

Nas amostras de água dos aquários, ACT e BFT, os Filos preponderantes foram aqueles mesmo cinco Filos registrados no intestino de *L. vannamei*. Contudo, estes cinco Filos corresponderam a 85% dos *reads*. O Filo mais abundante na água do BFT foi Proteobacteria, enquanto na água da ACT, essa posição foi atribuída ao Filo Firmicutes (Figura 4). Por outro lado, o Filo Planctomycetes não foi considerado entre os cinco Filos mais abundantes, apesar de seu percentual de abundância poder ser considerado relevante (7,1%) na composição da água de BFT, no início do experimento (BFT-A inicial, ou seja, nas condições originais nas quais os camarões se encontravam, antes do início do período de aclimação). Ao longo do experimento, nos demais aquários, este mesmo Filo mostrou-se pouco abundante. Cabe salientar que Planctomycetes é um Filo bacteriano distinto, tendo já sido isolado de água de diferentes procedências, como água doce, água salobra, água do mar, e, mesmo, água hipersalina (Schlesner, 1994), além de sedimentos de aquários marinhos e de água doce (Lage; Bondoso, 2012).

Figura 4: Abundância relativa da composição da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante (água clara tratada - ACT, e bioflocos - BFT). Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Filo.



ACT: amostras de intestino de camarões mantidos em água clara; BFT: amostras de intestino de camarões mantidos em bioflocos. BFT-A: amostras de água dos aquários de bioflocos; ACT-A: amostras de água dos aquários de água clara tratada; BFT-A inicial: amostras de água de bioflocos dos tanques iniciais, antes do período de aclimação; Pré: pré-infecção; Pós: pós-infecção com WSSV. Intestinos: média de cinco amostras por tratamento.

d. Abundância relativa em nível de gênero da comunidade microbiana de amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante

Com base nos dados de NGS, foi possível identificar os dez gêneros mais abundantes de micro-organismos nas amostras, e a relação entre os sistemas (ACT e BFT) e o tratamento (infecção viral) (Figura 5). Nas amostras intestinais, dois gêneros foram predominantes: *Cetobacterium* e *Bacillus*, independentemente do sistema. Entretanto, após a infecção, o gênero *Cetobacterium* prevaleceu sobre todos os outros. Observou-se aumento significativo de *Cetobacterium* após a infecção viral no intestino de animais da ACT (de 15,7% a 73,8%). Por outro lado, em amostras de intestino de BFT, este gênero, já presente em percentagem relativamente alta, ou seja, 65,3%, mostrou abundância relativa de 59,3% frente a infecção viral; diferença essa não significativa. Em relação ao gênero *Bacillus*, este diminuiu significativamente no intestino dos animais mantidos em ACT, após infecção por WSSV (de 56,2% a 0,6%). Também foram observadas porcentagens significativamente maiores do mesmo gênero nos intestinos de animais mantidos em ACT quando comparados aos intestinos de animais mantidos em BFT, antes da infecção pelo WSSV (intestinos de BFT: 18,1% a 0,6%).

Embora outros estudos tenham mostrado que uma infecção pode levar a um desequilíbrio na microbiota intestinal e, conseqüentemente, ao aumento de bactérias patogênicas (Chen et al., 2017), não observamos essa situação em relação ao gênero *Vibrio*, o qual também é composto por espécies de patógenos oportunistas. Mesmo tendo sido observado um pequeno aumento deste gênero de bactérias no intestino de camarões em ambos os sistemas, após a infecção viral, esse resultado não se mostrou como sendo significativo. *Vibrio* spp foi detectado em pequenas quantidades no intestino dos camarões, após a infecção pelo WSSV (a média percentual mais alta foi de 3,06%, na ACT). Apenas duas espécies de *Vibrio* foram identificadas, estando presentes em percentuais inferiores a 1%. A exceção foi a espécie *Vibrio shilonii*, cuja abundância percentual de 3,36% foi registrada em apenas uma única amostra intestinal, i.e., em um espécime mantido em ACT, após a infecção pelo WSSV. *Vibrio shilonii* é descrito como patógeno de corais (Munn, 2015). A segunda espécie do gênero *Vibrio* identificada foi *Vibrio pomeroyi*, descrito a partir de microrganismos isolados de algas verdes (Rizzo et al., 2016). Em amostras de água, o gênero *Vibrio* foi

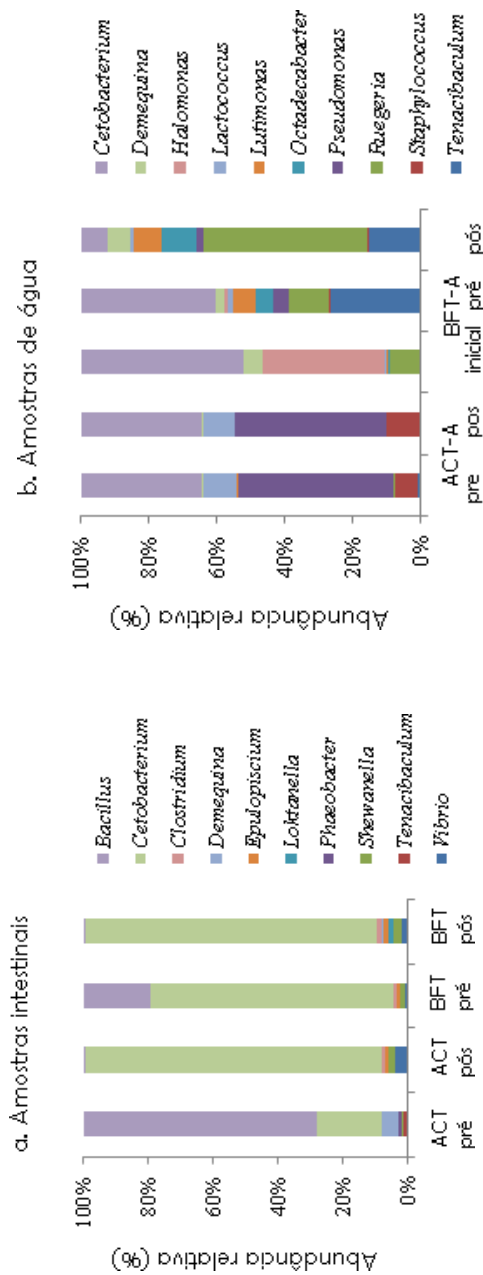
identificado em baixa quantidade (percentuais menores que 0,5%), independentemente do sistema, ACT ou BFT.

De forma semelhante, um dos principais gêneros com ação probiótica em crustáceos, *Lactobacillus* foi identificado em baixas percentagens (menor que 0,3%) dentre todas as amostras de intestino. Ademais, este gênero não foi identificado nas amostras de água dos tanques.

Diferentemente do resultado encontrado para a microbiota intestinal, em nível de gênero, *Bacillus* não foi encontrado entre os dez gêneros mais abundantes em amostras de água de ambos os sistemas, ACT e BFT. A microbiota da água também se mostrou como mais heterogênea em relação a microbiota intestinal. Devido ao BFT ser um sistema dinâmico, observamos uma mudança quanto aos gêneros predominantes em relação ao tempo de amostragem. No início do nosso experimento (BFT-A inicial), observou-se maior percentagem dos gêneros *Cetobacterium* (14,4%) e *Halomonas* (10,9%) na água de BFT. Após a aclimação, imediatamente antes da infecção viral, os dois gêneros mais abundantes encontrados foram *Cetobacterium* (12,2%) e *Tenacibaculum* (8,3%). Finalmente, após a infecção por WSSV (48h p.i), os gêneros *Ruegeria* (3,6%) e *Tenacibaculum* (1,2%) apresentaram maior abundância relativa. Por outro lado, a microbiota de água clara mostrou um perfil constante entre as amostragens, sendo *Pseudomonas* (de 10,6% a 6,4%) e *Cetobacterium* (de 8,3% a 5,2%) os dois gêneros mais abundantemente identificados. Portanto, a dinamicidade observada nos Gêneros predominantes foi característica do BFT.

Dentre os dez gêneros mais abundantes identificados, seis foram compartilhados em todas as amostras de intestino, independentemente do sistema ou do estado infeccioso, a saber, *Bacillus*, *Cetobacterium*, *Clostridium*, *Epulopiscium*, *Shewanella* e *Vibrio*. Apenas três gêneros mostraram-se comuns entre, pelo menos, uma amostra intestinal e uma amostra de água: *Cetobacterium*, *Demequina* e *Tenacibaculum*; Destes, apenas *Cetobacterium* foi encontrado em todas as amostras, sugerindo a ausência de relação entre a microbiota do intestino e aquela da água de produção.

Figura 5: Abundância relativa da composição da microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* e da água circundante (água clara tratada - ACT, e bioflocos - BFT). Descreve a frequência (%) da distribuição das bactérias, em termos de Gênero.

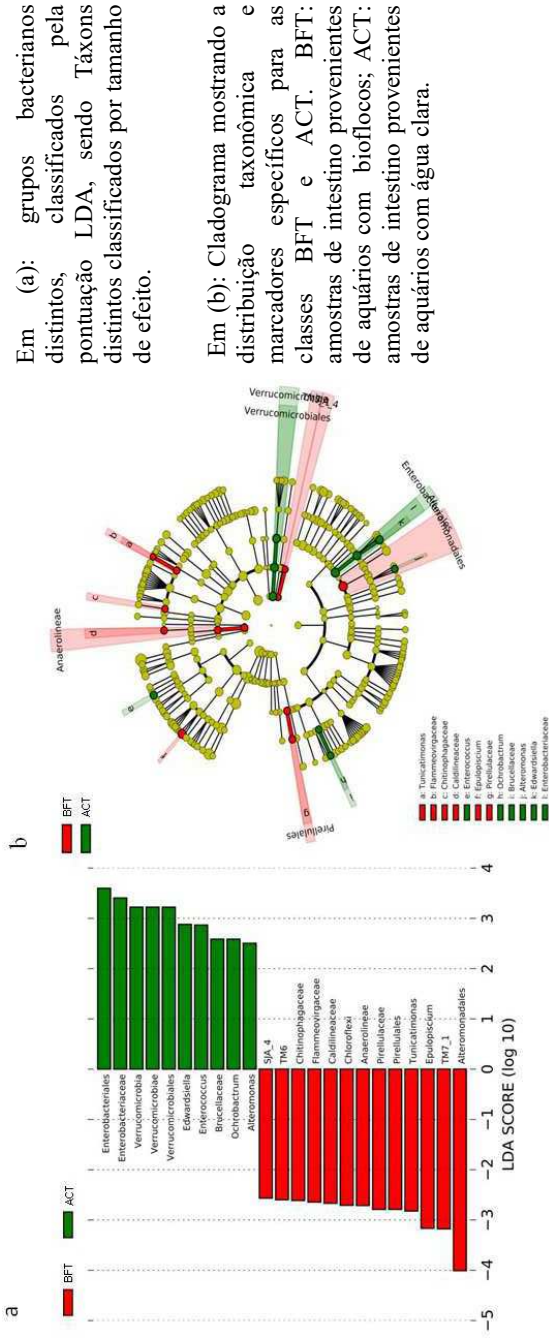


Em **a**: gêneros dominantes em amostras de intestino de *L. vannamei*. Em **b**: gêneros dominantes em amostras de água dos aquários. ACT: água clara tratada; BFT: bioflocos. Pré: pré-infecção; Pós: pós-infecção com WSSV. Inicial: amostras de água de bioflocos dos tanques iniciais, antes do período de aclimação.

e. Análise de Táxons bacterianos distintos

O método LefSe, ou análise discriminante linear associada ao tamanho de efeito, foi usado para identificar possíveis Táxons com relevância estatística e biológica dentro de classe (ACT e BFT) e subclasse (pré-infecção e pós-infecção), a partir da comparação de um tratamento com todos os outros (Figura 6). As amostras de água e de intestino foram analisadas separadamente. Somente as análises das amostras de intestino foram capazes de indicar a ocorrência de diferentes Táxons bacterianos entre sistemas. No nível de Gênero, dez Táxons formaram grupos diferentes no intestino de camarões mantidos em ACT, pontuando a Ordem Enterobacteriales com o maior tamanho de efeito entre a classe ACT. Por sua vez, 13 outros Táxons foram superiores no intestino de animais de BFT, destacando a Ordem Alteromonadales com pontuação LDA próxima a 4,0, ou seja, o maior tamanho de efeito. Não foram encontrados Táxons diferencialmente abundantes entre as amostras intestinais pré e pós-infecção.

Figura 6: Resultados do método LefSe utilizado na análise do microbioma intestinal de *Liopenaeus vannamei*, mostrando Táxons distintos em nível de Gênero, para as classes bioflocos (BFT) e água clara (ACT). Os táxons listados foram significativamente enriquecidos nas respectivas classes ($p < 0,05$; teste de Kruska-Wallis).



Em (a): grupos bacterianos distintos, classificados pela pontuação LDA, sendo Táxons distintos classificados por tamanho de efeito.

Em (b): Cladograma mostrando a distribuição taxonômica e marcadores específicos para as classes BFT e ACT. BFT: amostras de intestino provenientes de aquários com bioflocos; ACT: amostras de intestino provenientes de aquários com água clara.

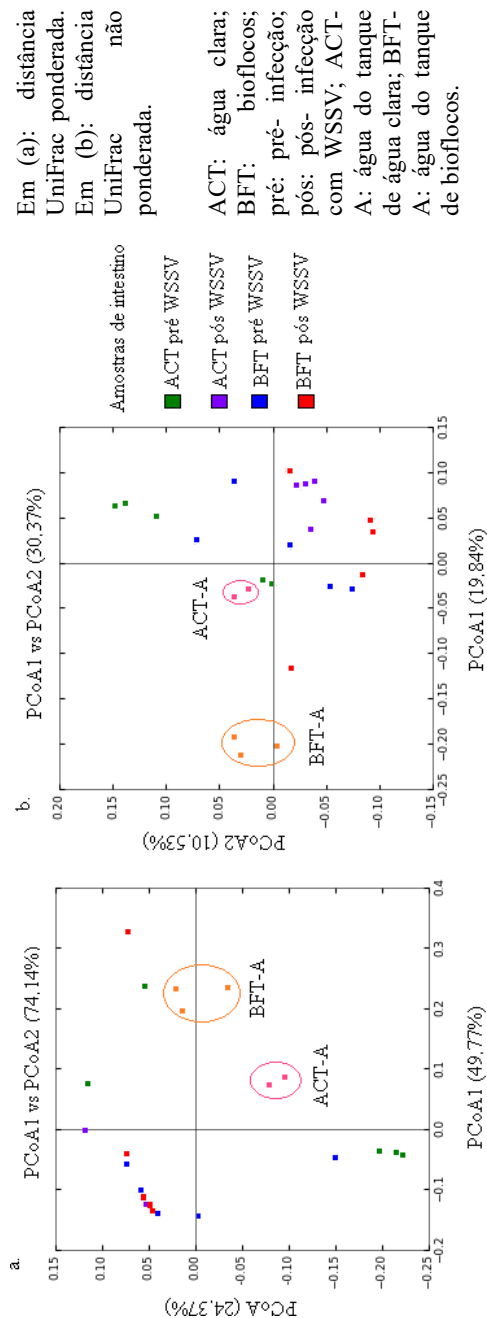
f. Similaridade das comunidades bacterianas

A avaliação da similaridade das populações bacterianas foi realizada através da Análise de Componentes Principais (PCoA), com base na distância Unifrac ponderada e não ponderada (Figura 7).

A análise mostrou uma distinção entre a comunidade bacteriana das amostras de intestino e de água dos aquários, além de ter indicado uma dessemelhança entre as amostras de intestino pré e pós infecção viral e entre a população de bactérias da água dos tanques de ACT e de BFT.

Na análise ponderada, as amostras intestinais de ACT pós-infecção, BFT pré, e BFT pós-infecção agruparam-se no segundo quadrante, em posição oposta às amostras de água, com a exceção de uma amostra em cada um dos tratamentos de BFT. Na análise não ponderada, todas as amostras de ACT pós-infecção foram agrupadas no quarto quadrante, estando as demais amostras de intestino dispersas entre primeiro, terceiro e quarto quadrantes. Cabe salientar que as três amostras de água do aquário de BFT destacaram-se, tendo sido agrupadas longe das amostras dos demais tratamentos.

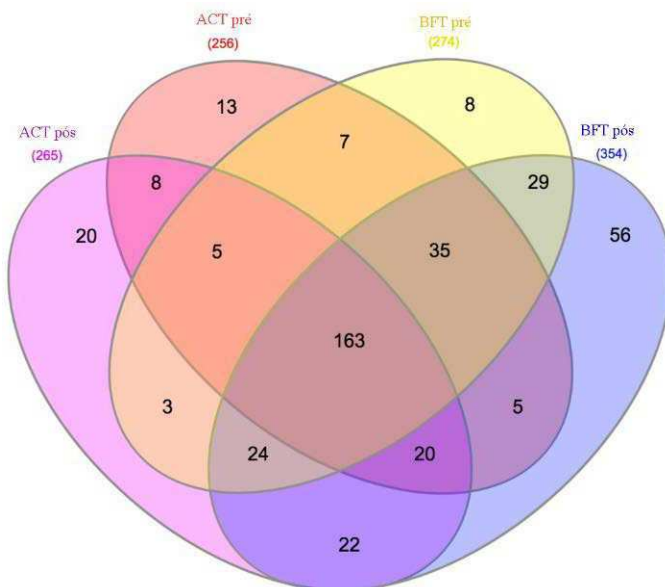
Figura 7: Diagramas de ordenação de Análise de Coordenadas Principais (PCoA), mostrando a correlação entre a comunidade bacteriana no intestino de *Litopenaeus vannamei* e a água circundante (bioflocos ou água clara), antes e após infecção experimental com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).



g. Microbiota elementar

A análise dos fragmentos da região alvo do gene *16S rRNA* envolveu, ainda, sua distribuição em OTUs (*Operational Taxonomic Units*). Para a procura de OTUs únicas ou compartilhadas em nível de Gênero, em termos quantitativos, construímos o diagrama de Venn (Figura 8). Elaborado somente com amostras de intestino, o diagrama de Venn mostrou que 163 OTUs (39% do total) foram compartilhadas entre todas as amostras intestinais, ou seja, 39% das OTUs não foram influenciadas sequer pelo sistema experimental (ACT e BFT), nem tampouco pela infecção viral. Em termos de sistema experimental, 41 OTUs (9%) foram observadas apenas na ACT, enquanto 93 OTUs (22%) eram únicas do BFT. Curiosamente, observamos um maior número de OTUs (98 OTUs, ou seja, 23%) após a infecção viral, em relação ao observado antes da infecção (28 OTUs, 6%).

Figura 8: Diagrama de Venn indicando OTUs (*Operational Taxonomic Units*) singulares e compartilhadas, em nível de Gênero, em intestino-de *Litopenaeus vannamei* mantidos em água clara (ACT) ou bioflocos (BFT), antes e após desafio com o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV).



Cada elipse representa um conjunto. A intersecção de duas ou mais elipses denota o número de OTUs compartilhadas entre conjuntos. Números fora da área de intersecção correspondem ao número de OTUs exclusivos de determinado conjunto.

Ademais, identificamos, apenas em amostras de intestino, a bactéria *Janthinobacterium lividum*, previamente encontrada no intestino do camarão *Penaeus monodon* (Rungrassame *et al.*, 2014). Esta bactéria de águas subterrâneas, aeróbica e Gram negativa, produz um pigmento chamado violaceína, o qual apresenta propriedades antimicrobianas e antitumorais. Ao colonizar a pele de algumas espécies de anfíbios, *J. lividum* protege contra o letal fungo *Batrachochytrium dendrobatidis* (Becker *et al.*, 2009). Isto posto, consideramos *J. lividum* como sendo digna de futuros estudos em camarões marinhos.

g. Outros resultados associados à caracterização da microbiota

A análise e a caracterização do perfil da microbiota em estudo mostraram, ainda, a presença de sete espécies de bactérias, as quais podem ser consideradas como potencialmente zoonóticas e/ou patogênicas para humanos. No entanto, esse resultado deve ser visto com a devida cautela, dado o seu escopo restrito, uma vez que não foram realizados testes para se determinar de fato a patogenicidade potencial destas cepas. Assim, a detecção destas espécies mostra-se pontual e isolada, tendo sido baseada exclusivamente em sequenciamento e, estando as mesmas presentes em baixos níveis quantitativos, sem que a esse resultado tenham sido associados qualquer tipo de ensaio de estabilidade e/ou infectividade. Cabe comentar que a água utilizada nos tanques experimentais foi bombeada da zona infralitoral do mar, por ponteiros submersas, na praia da Barra da Lagoa - Moçambique, costa leste da Ilha de Santa Catarina, Brasil, localizada na cidade de Florianópolis. Portanto, a água utilizada no experimento refletiu a comunidade bacteriana marinha no momento do bombeamento. Por outro lado, é importante salientar que o experimento aqui descrito ocorreu durante o verão, entre janeiro e fevereiro de 2016; estação do ano na qual a cidade de Florianópolis vivencia um aumento sazonal significativo da sua população, dado o afluxo turístico. A Tabela 2 mostra as sete espécies de bactérias mencionadas, bem como a sua origem e potencial patogênese associada em seres humanos.

Tabela 2: Identificação de bactérias com potencial zoonótico e/ou potencial patogênico para humanos na água dos tanques experimentais (bioflocos, BTF, e água clara, ACT), e em amostras de intestino de *Litopenaeus vannamei*, pré-infecção, e após infecção pelo vírus da mancha branca (WSSV).

Micro-organismo	Intestino de <i>L. vannamei</i> (%)				Amostras de água (%)				Patogênese em humanos	Observação *	Referências	
	ACT pré	ACT pós	BFT pré	BFT pós	ACT-A pré	ACT-A pós	BFT-A pré	BFT-A pós				
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0,002	0,011	0,013	0,014	0,009	0,002	0,000	0,036	0,00	Diarreia dos viajantes	Psicrotrofico	Adams e colab., 2016
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	0,000	0,000	0,000	0,042	0,000	0,000	0,000	0,003	0,002	Endocardite, peritonite, Infecção gastrointestinal	Alimentos contaminados, tais como camarões	Bauerfeind e colab., 2016
<i>Clostridium butyricum</i>	0,066	0,346	0,293	0,461	0,002	0,011	0,028	0,036	0,003	Comensal e ambiental; Estirpes patogênicas; Botulismo	Forma esporos	Dykes e colab., 2015; Cassir e colab., 2016
<i>Clostridium peyfringens</i>	0,025	0,196	0,077	0,12	0,028	0,005	0,148	0,181	0,005	Intoxicação alimentar; Gangrena gasosa	Forma esporos	Adams e colab., 2016
<i>Photobacterium damsela</i> (Anteriormente <i>Vibrio damsela</i>)	0,039	0,063	0,016	0,963	0,039	0,000	0,004	0,091	0,007	Ferida ulcerativa infecciosa; Fascite necrosante; Sepse	Peixe, frutos do mar, cetáceos; Formação de biofilme	Rivas e colab., 2013 Thompson e colab., 2006
<i>Plextomonas</i>	0,023	0,144	0,063	0,125	0,023	0,000	0,032	0,05	0,00	Diarreia aquosa	Peixes e frutos	Adams e colab.,

<i>shigelloides</i>				Infecção de pele	do mar são reservatórios naturais	2016						
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,027	0,101	0,112	0,335	1,456	1,215	0,011	0,138	0,034	Infecção hospitalar	Formação de biofilme	Gomes e colab. 2013

*Lista de características ou informações destacáveis de cada espécie de micro-organismo.

4. Discussão

Caracterizar a microbiota de um animal em condições de cultivo, bem como no ambiente que o cerca e, ainda, compreender a dinâmica dessa microbiota frente à ocorrência de uma enfermidade pode contribuir de fato para alcançar uma produção animal adequada. Algumas perguntas surgem dentro deste contexto, como, por exemplo: Pode uma infecção viral não entérica afetar a abundância ou a diversidade da microbiota intestinal? Sendo a água do mar o ambiente comum, tanto para micro-organismos marinhos, quanto para animais marinhos, existe relação entre o microbioma intestinal e a flora aquática circundante?

Dentro deste contexto, no presente trabalho, procuramos descrever comparativamente o perfil da microbiota do intestino de camarões juvenis, *Litopenaeus vannamei*, bem como do ambiente aquático circundante, água clara (ACT) e bioflocos (BFT). Ademais, avaliamos a dinâmica desta microbiota frente ao desafio experimental com o vírus da síndrome da mancha branca, WSSV. Em outras palavras, investigamos se, e como, a microbiota intestinal de *Litopenaeus vannamei* é influenciada pela água do tanque, seja ACT, ou BFT, e pela infecção pelo WSSV.

Dentre os Filos identificados, com base em dados obtidos por NGS, os cinco que se mostraram como aqueles mais abundantes foram os mesmos em todas as amostras (amostras de intestino, e amostras de água), independentemente da natureza da amostra, da infecção pelo WSSV (pré-infecção e 48h pós-infecção), ou do sistema de produção utilizado no experimento (ACT ou BFT). Nossos resultados mostram concordância com estudos recentes, em relação ao Filo Proteobacteria e Filo Firmicutes, confirmados entre os cinco Filos mais abundantes no intestino de *L.vannamei*. Os Filos Proteobacteria e Firmicutes podem ser considerados autóctones da microbiota intestinal de crustáceos, uma vez que foram identificados também em amostras intestinais e fecais de caranguejos (Ding et al., 2017), copépodes (Gerdts et al., 2013), camarões de água doce (Tzeng et al., 2015, Oetama et al., 2016) e, ainda, em *L.vannamei* (Cornejo-Granados et al., 2017). Neste último estudo, o Filo Proteobacteria foi relatado como sendo aquele mais abundante no hepatopâncreas, tanto de *L.vannamei* selvagens, como cultivados (abundância relativa de 93,8% e 97,7%, respectivamente) e, apesar de apresentar-se como o mais abundante também no intestino, o

percentual de abundância relativa foi menor, na ordem de 69% em camarões cultivados.

Em relação ao possível impacto da infecção pelo WSSV sobre a dinâmica da microbiota, nossos resultados apontam alteração significativa em amostras de intestino, apenas nos camarões de ACT, sendo esta alteração relacionada ao aumento da abundância relativa do Filo Fusobacteria.

De fato, este Filo já havia se apresentado como o mais abundante em amostras do mesmo tecido nos camarões do BFT, antes do desafio experimental. Nos camarões mantidos em ACT, a infecção por WSSV ocasionou um distúrbio, ou uma modulação na microbiota intestinal, levando à predominância desse Filo e, conseqüentemente, à diminuição da heterogeneidade microbiana.

Ademais, a perda de heterogeneidade também foi observada em nível de Gênero nas amostras intestinais. Embora o Filo Firmicutes tenha mostrado uma diminuição não significativa nas amostras intestinais da ACT, individualmente, o gênero *Bacillus* apresentou uma diminuição significativa neste tratamento. Após a infecção por WSSV, *Bacillus* spp. foram identificadas em pequenas porcentagens. Em contraste, o gênero *Cetobacterium* foi dominante em amostras intestinais, após a infecção viral, apontando para uma perda de heterogeneidade relacionada com a infecção. Interessante notar que um estudo recente sugeriu que, de modo geral, *Litopenaeus vannamei*, em condições de cultivo, tende a apresentar maior homogeneidade em sua microbiota intestinal, em comparação com espécimes selvagens (Cornejo-Granados et al., 2017). Esta diferença pode ser atribuída à composição microbiana pouco variável da alimentação, e à água com qualidade controlada em condições de cultivo.

Entre os táxons identificados, em termos de Gênero, o gênero *Cetobacterium*, anteriormente classificado como *Bacteroides* tipo A, é digno de maior atenção, pois foi o gênero que se mostrou predominante entre as amostras de intestino de *L.vannamei* no presente estudo. A presença desse gênero em intestino da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), peixe de água doce, foi considerada importante para a produção de vitamina B12 (cobalamina), conforme sugerido por Tsuchiya e colab. (2008). O gênero também foi identificado em fezes humanas (Finegold, 2003), e, recentemente, no intestino de mamíferos marinhos (Godoy-Vitorino, 2017).

No entanto, pouco se sabe sobre a produção de vitamina B12 em crustáceos, assim como sua possível relação com o gênero *Cetobacterium*. Em um estudo que buscou determinar a quantidade diária necessária da vitamina B12 na dieta de espécimes juvenis do caranguejo *Eriocheir sinensis*, Wei e colab. (2014) sugeriram um efeito positivo dessa vitamina sobre algumas das respostas imunes não específicas nesse crustáceo, frente à bactéria *Aeromonas hydrophila*.

Mais estudos são necessários para entender a distribuição de *Cetobacterium* spp. no trato digestivo de organismos aquáticos, principalmente em crustáceos, visando esclarecer uma provável relação simbiótica das bactérias intestinais pertencentes a esse gênero, e avaliar sua contribuição quantitativa de vitamina B12 para esses animais. Em particular, seria interessante investigar a presença da espécie *Cetobacterium somerae*, uma vez que a mesma é considerada como a maior produtora de vitamina B12, uma vez que há evidências de quando esta espécie se encontra presente na microbiota gastrointestinal de algumas espécies de peixes, como tilápias e carpas, não há necessidade de suplementação de vitamina B12 (Merrifield; Ringo, 2014).

A dinâmica bacteriana nas amostras de água dos aquários não se mostrou relacionada às amostras intestinais, especialmente em relação à análise em nível de Gênero. A ACT-A, i.e., a água do mar filtrada, mostrou ser mais estável, não apresentando, em termos comparativos, variação entre as amostragens. Por outro lado, a água do BFT apresentou um perfil de microbiota bem mais dinâmico em nível de Gênero, sendo observadas variações entre as amostragens. A constância observada na microflora da ACT-A pode ser entendida como reflexo do fato de que os parâmetros físico-químicos da água do mar neste sistema não apresentaram tanta flutuação, como observado na BFT-A. Em outras palavras, a ACT-A tende a apresentar menor quantidade de matéria orgânica, bem como variações menores em parâmetros de qualidade de água, como oxigênio dissolvido, formas dissolvidas de nitrogênio e sólidos em suspensão, os quais interferem na composição da microbiota do ambiente aquático. Esta hipótese também é apoiada pela ausência de Táxons distintos nas amostras de água de ACT, conforme o método LefSe. Independente da ausência de réplicas, as amostras de ACT-A e BFT-A, como esperado, mostraram ser bastante diferentes entre si, dificultando, assim, a observação de Táxons específicos e distintos.

Mesmo em discordância parcial com os resultados da abundância relativa, os índices de rarefação α não mostraram diferença, ou seja, em

outras palavras, apontaram que todos os tratamentos apresentaram a mesma diversidade e riqueza bacteriana.

No entanto, ao analisarmos os gráficos obtidos, em particular aqueles relacionados com a análise de abundância relativa em nível de Gênero, e os gráficos da análise por PCoA, é factível sugerir que a ausência de diferenças nos índices α relativos à água dos aquários tenha sido devido à questão de réplicas destas amostras. Provavelmente, com um número maior de amostras de água, observaríamos maior diversidade e riqueza do perfil bacteriano. Em vista desse resultado, a infecção viral pelo WSSV parece não ter provocado qualquer alteração na diversidade e/ou na riqueza do microbioma da água dos aquários. Por outro lado, Cornejo-Granados e colab. (2017) ao compararem a diversidade bacteriana em sedimentos de tanques de cultivo de *Litopenaeus vannamei* sadios e com sintomas de EMS/AHPND (Síndrome da Mortalidade Precoce, ou Síndrome da Necrose Aguda do Hepatopâncreas), doença de etiologia bacteriana, observaram uma diferença significativa em relação à diversidade bacteriana, a qual se mostrou menor no sedimento dos tanques com camarões doentes. Mesmo considerando a distinção em relação ao agente etiológico (vírus *versus* bactéria) e as amostras do ambiente circundante (água *versus* sedimento) nos dois estudos, concordamos com os referidos autores quando afirmam que uma doença infecciosa pode alterar a microbiota, uma vez que, ao analisarmos nossos resultados em termos de abundância relativa, a infecção por WSSV levou a uma diminuição no gênero *Bacillus* e a uma predominância de *Cetobacterium* spp.

Em relação às OTUs, podemos considerar que OTUs compartilhadas entre organismos sadios e organismos doentes possam representar aquelas selecionadas pela genética e fisiologia dos hospedeiros e que permanecem, independente do estabelecimento de um estado patológico e/ou da influência do ambiente (sistema de cultivo, por exemplo).

Assim sendo, independentemente da infecção viral ou do sistema de cultivo experimental em que os camarões foram mantidos, as amostras intestinais compartilharam 39% das OTUs. Além disso, entre os dez gêneros com maior abundância relativa, seis foram identificados em todas as amostras intestinais. Estes podem ser considerados como flora autóctone ou permanente dos camarões analisados em nosso experimento, e/ou reflexo de sua genética ou fisiologia, como por exemplo, *Bacillus*, *Cetobacterium*, *Clostridium*, *Epulopiscium*, *Shewanella* e *Vibrio*.

Bacillus é considerado como o principal gênero com ação probiótica em crustáceos. *Shewanella* também é considerado como possível probiótico, enquanto *Vibrio*, considerado uma bactéria natural de crustáceos, tem seu uso comercial como probiótico ainda limitado (Castex et al., 2014; Hao et al., 2014). De fato, *Vibrio*, juntamente com *Pseudomonas*, também já foi citado como flora indígena predominante em camarões marinhos (Lakshmi et al., 2013).

Sublinhamos aqui a ínfima quantidade do gênero *Lactobacillus* identificada. Este gênero é um dos principais micro-organismos com ação probiótica em crustáceos (Castex; Daniels; Cheim, 2014), e tem sido associado a maior resistência contra infecções bacterianas e virais (Peraza-Gomes et al., 2009; Thammason et al., 2017), incluindo WSSV (Sandeepa; Ammani, 2017). Sendo assim, a suplementação da dieta com *Lactobacillus* sp. tem sido considerada como benéfica e tem sido incentivada, a fim de resultar em um efeito imunestimulante e conferir maior resistência a eventuais doenças infecciosas.

Podemos destacar, ainda, um grande número de OTUs compartilhado entre amostras intestinais, independentemente do estado de infecção, ou sistema experimental, até mesmo superando o número de OTUs exclusivas de um dado sistema, ou do estado de infecção, bem como os seis gêneros comumente sempre presentes. Desta forma, podemos inferir que, no presente estudo, a infecção por WSSV pode ter causado um ligeiro desequilíbrio na microbiota do intestino dos camarões de ACT. Contudo o vírus não interferiu com a estrutura da comunidade bacteriana intestinal de *L. vannamei*, em termos de diversidade e riqueza, e em número de OTUs compartilhadas.

O desafio com o WSSV levou, como esperado, à manifestação de alguns sinais clínicos, como, entre outros, a alteração da coloração corporal que passou a avermelhada, associada à letargia. O conjunto de sinais clínicos visíveis não é, necessariamente, advindo exclusivamente da infecção viral, mas pode refletir também prováveis infecções bacterianas secundárias, as quais são oportunizadas pela infecção viral (Jayasree et al., 2006). A alta mortalidade observada em ambos os sistemas, após o desafio viral, foi provavelmente decorrente de alterações relacionadas a respostas bioquímicas e / ou imunes, mas não devido a um grande desequilíbrio do microbioma intestinal. Excetua-se a significativa diminuição do gênero *Bacillus* em animais mantidos em água clara, diminuição esta que pode ter influenciado a alta mortalidade observada, visto o gênero ter importância probiótica. Isto posto, o WSSV parece ser suficientemente virulento e letal, mesmo em sistemas

bem gerenciados, sem que, aparentemente, seja observada grande mudança na dinâmica da microbiota intestinal dos camarões infectados. Sob outra perspectiva, a disbiose pontual em *L. vannamei* traz uma grande oportunidade para a carcinicultura: o uso de imunostimulantes na produção é favorecido, uma vez que a microbiota tende a ser estável, mesmo em face à infecção por WSSV. Assim, o uso de probióticos, prebióticos ou simbióticos é benéfico, mesmo que ocorra a WSD.

Os resultados da análise de PCoA revelaram que a comunidade bacteriana intestinal apresentava-se dispersa, mostrando dissimilaridade entre si, independentemente se proveniente de BFT ou ACT, em especial na comparação entre animais infectados *versus* animais não infectados no gráfico de distância UniFrac não ponderada. De maneira oposta, a população de bactérias na água dos aquários foi agrupada separadamente, formando dois grupos distintos: BFT e ACT, sugerindo que a microbiota intestinal em *L. vannamei* pode não estar relacionada à água de produção, e que outros fatores podem ter maior impacto em sua composição.

Nos vertebrados, o microbioma intestinal é influenciado pela dieta, filogenia e morfologia do hospedeiro, sendo que não há associação com populações de vida livre (Ley et al., 2008). Em invertebrados, Tzeng e colab. (2015) apontaram, no camarão de água doce *Macrobrachium nipponense*, que sua genética e dieta têm maior influência no microbioma intestinal do que seu habitat. Da mesma forma, Chen e colab. (2017) observaram baixa semelhança entre comunidades bacterianas da água do mar e do intestino de *L. vannamei*. No presente estudo, o gráfico PCoA ponderado, que considera a diversidade, mostrou uma separação mais óbvia entre ACT-A, BFT-A e intestinos; ou seja, o microbioma da água dos aquários não teve semelhança com o microbioma intestinal. Na prática, isso significa, por exemplo, ser preferível usar probióticos na alimentação ao seu uso como aditivo na água de produção. No entanto, o gráfico PCoA não ponderado, o qual somente leva em consideração a presença e a ausência, sem considerar a diversidade, mostrou que a comunidade bacteriana de ACT-A aglomerou-se mais próxima da comunidade intestinal, enquanto aquela do BFT-A agrupou-se, obviamente, em separado. Como o bioflocos é um sistema dinâmico e vivo, em constante mudança, poder-se-ia esperar que nele a microflora se apresentasse como mais dessemelhante em relação a qualquer outra amostra.

Com base no método LEfSe, observamos dois grupos bacterianos distintos no intestino dos camarões mantidos em dois sistemas

experimentais completamente diferentes, ACT e BFT. Por outro lado, não houve diferença entre as comunidades microbianas em relação à infecção por WSSV. Notavelmente, duas Ordens, pertencentes à Classe Gammaproteobacteria (Filo Proteobacteria) foram significativamente alteradas: Alteromonadales foi aumentada em BFT, enquanto Enterobacteriales foi enriquecida em ACT. Sabe-se que o Filo mais abundante em águas marinhas e bioflocos é o Filo Proteobacteria, sendo Gammaproteobacteria a principal Classe encontrada em água marinha (Ahmad et al., 2017; Kirchman, 2012). Embora não tenha havido semelhança entre as amostras de água dos aquários (ACT e BFT) e a microbiota intestinal em termos de composição da microbiota, nossos resultados indicam que o sistema de produção teve um efeito significativo no microbioma intestinal dos camarões, ou seja, a presença de diferentes micro-organismos no intestino dos animais foi relacionada ao sistema de cultivo no qual foram mantidos.

A produção animal pode apresentar um risco associado: a presença de microorganismos com potencial zoonótico e potencial patogênico para humanos.

Em nosso estudo, a presença de microorganismos associados a essas categorias foi detectada em baixas porcentagens, possivelmente abaixo da dose infecciosa provável, tanto como parte da microbiota do intestino dos camarões, como também como micro-organismos de vida livre na coluna de água, não havendo sido realizado, no entanto, qualquer teste de viabilidade e/ou infectividade. Ademais, cabe salientar que esses resultados devem ser considerados dentro do cenário em que o experimento ocorreu, ou seja, em termos sazonais, uma vez que o experimento foi realizado na estação de verão, quando a temperatura da água do mar apresenta-se mais elevada (na média, entre 25 °C e 29 °C) na região, podendo influenciar a taxa metabólica microbiana, além do fato das áreas costeiras tornarem-se mais povoadas, devido ao turismo intenso nesse período do ano. De maneira nenhuma a identificação destas bactérias reflete uma questionável qualidade sanitária da produção.

Alguns patógenos ocorrem naturalmente em águas marinhas, enquanto a presença de outros está relacionada à contaminação de origem antrópica, o que indica a importância da adoção de indicadores relacionados às descargas na costa, bem como o biomonitoramento dessas áreas.

De qualquer modo, patógenos marinhos são considerados como frequentemente associados a animais marinhos, fitoplâncton, sedimentos e sólidos em suspensão (Maugeri et al., 2004; Thompson et al., 2006).

Excluindo o mercado costeiro feito diretamente por pescadores artesanais ou pequenos intermediários, no contexto no qual os camarões são vendidos frescos, os camarões são mais comumente comercializados congelados ou, em alguns casos, cozidos. Esses processos visam evitar a deterioração após a captura. No entanto, micro-organismos psicrotróficos ou formadores de esporos, como *Aeromonas hydrophila* e *Clostridium* spp., ou, ainda, *Plesiomonas shigelloides* que sobrevive ao congelamento, podem permanecer no alimento e representar uma fonte potencial de intoxicação alimentar, considerando uma produção, ou pós-produção, ou beneficiamento com baixo controle sanitário.

Por fim, ressaltamos que a carcinicultura brasileira, assim como toda a produção aquícola nacional, prima pela segurança alimentar em seu produto. As Boas Práticas de Produção Aquícola (BPPA) são procedimentos rotineiros nas produções nacionais. Podemos também ressaltar algumas normativas que regulamentam a produção para que a qualidade do produto aquícola brasileiro seja sempre de excelência, como o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos (MAPA, IN 53, 2013) e o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos de Cultivo - "Aquicultura com Sanidade" (MPA², IN 4, 2015; alterada pela IN 10, 2015).

5. Conclusão

Em resumo, nosso estudo mostra que a infecção por WSSV leva a uma perda de heterogeneidade da microbiota intestinal, especialmente em *L. vannamei* mantidos em ACT, observada na dessemelhança entre microbiotas pré e pós infecção viral. Contudo, a infecção viral não leva a alterações de diversidade ou riqueza da microbiota.

Notavelmente, a microflora da água circundante mostrou ser diferente da microbiota intestinal, isto é, a microflora do ambiente de produção tem pouca semelhança com a composição do microbioma

² Ministério da Pesca e Aquicultura. Este Ministério existiu entre 2003 e 2015, sendo incorporado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em outubro de 2015.

intestinal, apesar de influenciar em sua composição. Portanto, as altas mortalidades observadas na infecção experimental foram causadas por outros fatores, não sendo possível associa-las a um grande desequilíbrio do microbioma intestinal.

Em suma, hoje se almeja uma carcinicultura sustentável em todos os seus aspectos. Para que esta meta seja realidade, devem ser harmonizados diferentes pilares: a rentabilidade do empreendimento para o produtor, a qualidade do corpo técnico, aliada à realização do trabalho com propriedade, segurança e satisfação, o fornecimento de um produto de qualidade, inócuo e com preço atrativo para o consumidor, os quais devem ser, ainda, aliados, à produção amigável ao meio ambiente, à biossegurança, e à ética no manejo animal.

6. Agradecimentos

Agradecemos à coordenação e equipe do Laboratório de Camarões Marinho - LCM (Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil) pela assistência durante o experimento. Agradecemos também aos técnicos da Escola de Ciências Biológicas e Marinhas, Universidade de Plymouth, Reino Unido, por seu suporte no sequenciamento das amostras e na análise dos dados. CSV recebeu uma bolsa CAPES-PDSE do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura na UFSC. MRFM é destinatária de uma bolsa de pesquisa de produtividade do CNPq (Proc. n° 311099 / 2012-0). Este estudo foi financiado pelo CNPq (Edital Universal Proc. n° 407211 / 2012-8).

7. Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

8. Referências

Adam, M.R., Moss, M.O., CaClure, P. Bacterial Agents of Foodborne Illness. In:_____. **Food Microbiology**. 4ed. United Kingdom: Royal Society of Chemistry, 2016. p.200-302.

Ahmad, I., Rani, A.B., Verma, A.K., Maqsood, M. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. **Aquaculture International**, v.25, n.3, p.1215-1226, 2017.

Australian Government. Department of Agriculture and Water Resources. Report into the cause of White Spot Syndrome Virus outbreak in the Logan River area of Queensland – December 2016. **Department of Agriculture and Water Resources**, Commonwealth, Canberra, 2017.

Bauerfeind, R., Graevenitz, A., Kimmig, P., Schiefer, H.G., Schwarz, T., Slenczka, W., Zahner, H. In:_____. **Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans**. 4ed. Canada: ASM Press, 2016. p.175-292.

Becker, M.H., Brucker, R.M., Schwantes, C.R., Harris, R.N., Minbiole, K.P. The bacterially produced metabolite violacein is associated with survival of amphibians infected with a lethal fungus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.21, p.6635-8, 2009.

Cardona, E., Gueguen, Y., Magré, K., Lorgeoux, B., Piquemal, D., Pierrat, F., Noguier, F., Saulnier, D. Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. **BMC Microbiology**, v.16, n.1, p.157-165, 2016.

Cassir, N., Benamar, S., La Scola, B. *Clostridium butyricum*: from beneficial to a new emerging pathogen. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, n.1, p.37-45, 2016.

Castex, M., Daniels, C., Chim, L. Probiotic Applications in Crustaceans. In: **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. (ed D. Merrifield, E. Ringø), Chichester, UK : John Wiley & Sons, Ltd, 2014, p.290-327.

Chen, W.Y., Ng, T.H., Wu, J.H., Chen, J.W., Wang, H. C. Microbiome dynamics in a shrimp grow-out pond with possible outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease. **Scientific Reports**, v.7, 2017.

Cornejo-Granados, F., Lopez-Zavala, A. A., Gallardo-Becerra, L., Mendoza-Vargas, A., Sánchez, F., Vichido, R., Ochoa-Leyva, A. Microbiome of Pacific whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between wild, aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. **Scientific Reports**, v.7, n.1, p.11783, 2017.

Crab, R., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete, W. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**, v.356-357, p.351-356, 2012.

Crab, R., Lambert, A., Defoirdt, T., Bossier, P., Verstraete W. The application of bioflocs technology to protect brine shrimp (*Artemia franciscana*) from pathogenic *Vibrio harveyi*. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, p.1643-1649, 2010.

Ding, Z.F., Cao, M.J., Zhu, X.S., Xu, G.H., Wang, R.L. Changes in the gut microbiome of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) in response to white spot syndrome virus (WSSV) infection. **Journal of fish Diseases**, v.40, n.11, p.1561-1571, 2017.

Dykes, J.K., Lúquez, C., Raphael, B.H., McCroskey, L., Maslanka, S.E. Laboratory investigation of the first case of botulism caused by *Clostridium butyricum* type E toxin in the United States. **Journal of clinical microbiology**, v.53, n.10, p.3363-3365, 2015.

Emerenciano, M.G.C., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., Miranda-Baeza, A. Biofloc Technology (BFT): A tool for water quality

management in aquaculture. In: Tutu, H. **Water quality**. In tech. 2017, p.91-109.

Finegold, S. M., Vaisanen, M. L., Molitoris, D. R., Tomzynski, T. J., Song, Y., Liu, C., ... Lawson, P. A. *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. **Systematic and applied microbiology**, v.26, n.2, p.177-181, 2003.

Gajardo, K., Rodiles, A., Kortner, T.M., Krogdahl, Å., Bakke, A. M., Merrifield, D.L., Sørum, H. A high-resolution map of the gut microbiota in Atlantic salmon (*Salmo salar*): A basis for comparative gut microbial research. **Scientific Reports**, v.6, 2016.

Gerdts, G., Brandt, P., Kreisel, K., Boersma, M., Schoo, K.L., Wichels, A. The microbiome of North Sea copepods. **Helgoland Marine Research**, v.67, n.4, p.757, 2013.

Godoy-Vitorino, F., Rodriguez-Hilario, A., Alves, A. L., Gonçalves, F., Cabrera-Colon, B., Mesquita, C. S., ..., Eira, C. The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. **Research in Microbiology**, v.168, n.1, p.85-93, 2017.

Gomes, F., Teixeira, P., Oliveira, R. Mini-review: *Staphylococcus epidermidis* as the most frequent cause of nosocomial infections: old and new fighting strategies. **The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v.30, p.131-141, 2013.

Gonçalves, P., Guertler, C., Bachère, E., de Souza, C. R., Rosa, R. D., Perazzolo, L. M. Molecular signatures at imminent death: hemocyte gene expression profiling of shrimp succumbing to viral and fungal infections. **Developmental & Comparative Immunology**, v.42, n.2, p.294-301, 2014.

Grice, E. A., Segre, J. A. The human microbiome: our second genome. **Annual review of genomics and human genetics**, v.13, p.151-170, 2012.

Hao, K., Liu, J. Y., Ling, F., Liu, X. L., Lu, L., Xia, L., Wang, G. X. Effects of dietary administration of *Shewanella haliotis* D4, *Bacillus cereus* D7 and *Aeromonas bivalvium* D15, single or combined, on the growth, innate immunity and disease resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.428, p.141-149, 2014.

Heberle, H., Meirelles, G. V., da Silva, F. R., Telles, G. P., Minghim, R. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics** v.16, n.169, 2015.

Huang, Z., Li, X., Wang, L., Shao, Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v.47, n.6, p. 737-1746, 2016.

Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R. Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.37, n.4, p.523-532, 2006.

Karst, S.M. The influence of commensal bacteria on infection with enteric viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, n.4, p.197-204, 2016.

Karthikeyan, V., Selvakumar, P., Gopalakrishnan, A. A novel report of fungal pathogen *Aspergillus awamori* causing black gill infection on *Litopenaeus vannamei* (Pacific white shrimp). **Aquaculture**, v.444, p.36-40, 2015.

Kirchman, D.L. Community structure of microbes in natural environments. In:_____. **Process in Microbial Ecology**. Oxford: Oxford University Press, 2012. p.157-176.

Kostic, A. D., Howitt, M. R., Garrett, W. S. Exploring host–microbiota interactions in animal models and humans. **Genes & development**, v.27, n.7, p.701-718, 2013.

Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powel, E.N., Rondeau, D., Saksida, S. M. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. **Annual review of marine science**, v.7, p.471-496, 2015.

Lage, O. M., Bondoso, J. Bringing Planctomycetes into pure culture. **Frontiers in microbiology**, v.3, 2012.

Lakshmi, B., Viswanath, B., Sai Gopal, D. V. R. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. **Journal of Pathogens**, v.2013, 2013.

Lederberg, J., McCray, A.T. 'Ome sweet 'omics - a genealogical treasury of words. **The Scientist**, v.15, n.8, 2001.

Ley, R.E., Lozupone, C.A., Hamady, M., Knight, R., Gordon, J.I. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. **Nature reviews. Microbiology**, v.6, n.10, p.776, 2008.

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Tang, K.F.J., Noble, B.L., Schofield, P., Mohney, L.L., Nunan, L.M., Navarro, S.A. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of invertebrate pathology**, v.110, n.2, p.174-183, 2012.

Mark, V. Epigenetics: reading the second genomic code. **Nature**, v.91, p.143-147, 2012.

Maugeri, T.L., Carbone, M., Fera, M.T., Irrera, G.P., Gugliandolo, C. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton associated in a marine coastal zone. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, n.2, p.354-61, 2004.

Merrifield, D., Ringo, E. Aquaculture Nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. **United Kingdom: John Wiley & Sons, 2014. 488p.**

Munn, C.B. The Role of *Vibrio* in diseases of corals. **Microbiology spectrum**, v.3, n.4, 2015.

Noga, E.J., Hancock, A.L., Bullis, R.A. In: Lewbart, G. A. **Invertebrate Medicine**. USA: Blackwell Publishing, 2006, p.179-193.

Oetama, V.S., Hennersdorf, P., Abdul-Aziz, M.A., Mrotzek, G., Haryanti, H., Saluz, H.P. Microbiome analysis and detection of pathogenic bacteria of *Penaeus monodon* from Jakarta Bay and Bali. **Marine Pollution Bulletin**, v.110, n.2, p.718-725, 2016.

OIE (Office International des Epizooties). **Disease timelines**. 2016. Disponível em: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/DiseaseTimelines Acesso em: 24 maio. 2017.

Peraza-Gómez, V., Luna-González, A., Campa-Córdova, Á. I., López-Meyer, M., Fierro-Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P. Probiotic microorganisms and antiviral plants reduce mortality and prevalence of WSSV in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. **Aquaculture research**, v.40, n.13, p.1481-1489, 2009.

Rivas, A.J., Lemos, M.L., Osorio, C.R. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a bacterium pathogenic for marine animals and humans. **Frontiers In Microbiology**, v.4, 2013.

Rizzo, L., Frascchetti, S., Alifano, P., Tredici, M.S., Stabili, L. Association of *Vibrio* community with the Atlantic Mediterranean invasive alga *Caulerpa cylindracea*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.475, p.129-136, 2016.

Roeselers, G., Mittge, E.K., Stephens, W.Z., Parichy, D.M., Cavanaugh, C. M., Guillemin, K., Rawls, J.F. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. **The ISME Journal**, v.5, n.10, p.1595-1608, 2011.

Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Chaiyapechara, S., Jiravanichpaisal, P., Karoonuthaisiri, N. Characterization of intestinal bacteria in wild and domesticated adult black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **PloS One**, v.9, n.3, e91853, 2014.

Rungrasamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S., Karoonuthaisiri, N. Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.133, p.12-19, 2016.

Sandeepa, G.M.; Ammani, K. Immunological and Antioxidant Response of *Litopenaeus vannamei* fed with *Lactobacillus* species under WSSV challenge. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.11, n.1, p.43-52, 2017.

Schlesner, H. The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other Planctomycetales from various aquatic habitats using dilute media. **Systematic and applied microbiology**, v.17, n.1, p.135-145, 1994.

Tang, K.F., Pantoja, C.R., Redman, R.M., Han, J.E., Tran, L.H., Lightner, D.V. Development of in situ hybridization and PCR assays for the detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP), a microsporidian parasite infecting penaeid shrimp. **Journal of invertebrate pathology**, v.130, p.37-41, 2015.

Thammasorn, T., Jitrakorn, S., Charoonnart, P., Sirimanakul, S., Rattanarojpong, T., Chaturongakul, S., Saksmerprome, V. Probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) expressing specific double-stranded RNA and its potential for controlling shrimp viral and bacterial diseases. **Aquaculture International**, v.25, n.5, p.1679-1692, 2017.

Thompson, J.R., Marcelino, L.A., Polz, M.F. Diversity, Sources, and Detection of Human Bacterial Pathogens in the Marine Environment. In: Belkin, S., Colwell, R.R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. USA: Springer, 2005. p.29-68.

Tsuchiya, C., Sakata, T., Sugita, H. Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, p.43 –48, 2008.

Tzeng, T. D., Pao, Y. Y., Chen, P. C., Weng, F. C. H., Jean, W. D., Wang, D. Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of

oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). **PLoS One**, v.10, p.7, e0132860, 2015.

Wei, J., Yu, N., Tian, W., Zhang, F., Wu, Q., Li, E., ..., Chen, L. Dietary vitamin B 12 requirement and its effect on non-specific immunity and disease resistance in juvenile Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. **Aquaculture**, v.434, p.179-183, 2014.

Yan, D.C., Huang, J., Yang, B., Sun, H.S., Wang, Y.Y., Liu, X. Competition of infectious hypodermal and haematopoietic necrosis virus (IHHNV) with white spot syndrome virus (WSSV) for binding to shrimp cellular membrane. **Journal of Fish Diseases**, v.39, n.10, p.1225-1229, 2016.

Zhu, B., Wang, X., Li, L. Human gut microbiome: the second genome of human body. **Protein & Cell**, v.1, p.718-724, 2010.

CONCLUSÕES GERAIS

A carcinicultura contemporânea busca uma produção sustentável, economicamente viável e de alta tecnologia. Entre as estratégias que buscam contribuir com estes objetivos, estão alternativas relativas ao sistema de cultivo. Apesar do sistema semi-intensivo em viveiros de terra representar, ainda, o principal modelo de produção na carcinicultura em nível mundial, a alternativa de produção do camarão branco do Pacífico, *Litopenaeus vannamei*, em sistemas intensivos e mais biosseguros tem sido utilizada em alguns países produtores, inclusive no Brasil.

Neste contexto, o presente estudo procurou contribuir para o entendimento da complexa tríade patógeno *versus* hospedeiro *versus* ambiente, associada ao cultivo de camarões, em sistema de bioflocos (BFT).

Nossos resultados mostram que o Vírus da Síndrome da Mancha Branca (WSSV), um dos principais patógenos virais que tem impactado a carcinicultura mundial desde a última década de 90, é capaz de modular a transcrição de genes relacionados, direta ou indiretamente, com as respostas moleculares de defesa de *Litopenaeus vannamei* infectados. Mesmo tendo sido essa modulação decorrente da análise de um conjunto restrito de genes alvo selecionados, os resultados indicam que a mobilização se dá em duas frentes, uma vez que envolve tanto respostas de defesa do hospedeiro, quanto mecanismos celulares que possibilitam a manutenção da replicação viral. Assim sendo, a ampliação desse painel gênico, associada à comparação do perfil de modulação ora obtido (48 horas pós-infecção) com aqueles das primeiras horas de infecção (i.e., 6 horas pós-infecção) e ao estudo dos mecanismos envolvidos na transcrição destes genes pode ampliar o entendimento da relação patógeno-hospedeiro. Desta forma, a infecção viral influenciou o perfil transcricional frente aos dois sistemas, i.e., após infecção com WSSV, a transcrição gênica foi diferente nos animais mantidos em BFT *versus* os mantidos em ACT.

Da mesma forma, mostramos que o WSSV é capaz de influenciar, mesmo que de forma relativamente limitada, a microbiota intestinal de camarões infectados, levando a um discreto distúrbio no perfil da mesma, associado à perda de heterogeneidade, conforme constatado na dessemelhança observada entre as microbiotas pré e pós infecção viral. Digno de nota é que a microflora circundante, ou seja, os

micro-organismos presentes na água de produção dos sistemas experimentais (BFT e água clara) não foram semelhantes à microbiota intestinal, apresentando diferenças em termos de diversidade e riqueza.

Por fim, é importante salientar que, após a infecção com o WSSV, observamos mortalidade em um intervalo temporal menor entre os camarões mantidos em BFT, em comparação àqueles mantidos em ACT. Ademais, e mais relevante, a taxa de mortalidade foi maior entre os camarões de BFT infectados.

Esse resultado sugere que, mesmo sendo o BFT considerado como um sistema mais biosseguro, uma vez ocorrendo a entrada de um patógeno de alta virulência, como o WSSV, a mortalidade pode ser mais expressiva, acarretando perdas significativas na produção mais rapidamente. Portanto, para que venha a se alcançar uma carcinicultura cada vez mais tecnológica, produtiva e sustentável, faz-se necessário incorporar um conjunto de estratégias contínuas de prevenção de enfermidade na produção, assim como aprofundar o conhecimento relativo às patologias, às bases moleculares das respostas de defesa do hospedeiro e às características genéticas dos plantéis.

Como perspectivas futuras, um estudo no qual a infecção pelo WSSV fosse realizada na forma de sua ocorrência natural, i.e., por via oral, mostra-se de grande valor. Da mesma forma, amostragens no início da infecção, como por exemplo, 6h, 12h e 24h pós-infecção viral, tanto da água dos aquários, quanto dos tecidos poderiam ser realizadas. Poder-se-ia, ainda, realizar uma análise comparativa com os nossos resultados aqui apresentados, observando se ocorrem alterações na microbiota intestinal, assim como se esta influenciaria, ou não, a infecção viral, quando da infecção por via oral. Assim, além de ampliar os resultados aqui relatados, buscar-se-iam ainda marcadores moleculares precoces, no início da infecção, avaliando, também, ao longo do tempo, a dinâmica da transcrição gênica. Por fim, frente à dinamicidade do bioflocos, investigar-se-ia a sobrevivência dos camarões infectados com WSSV neste sistema, de modo a avaliar de forma mais ampla a relação deste parâmetro com variações na composição e/ou nas características do bioflocos.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

ABCCAM. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. **História da carcinicultura no Brasil**, 2011. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/historia-da-carcinicultura-no-brasil/> Acesso em: 21 nov.2017.

Ahmad, I., Rani, A.B., Verma, A.K. and Maqsood, M. Biofloc technology: an emerging avenue in aquatic animal healthcare and nutrition. **Aquaculture International**, v.25, n.3, p.1215-1226, 2017.

Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, W.P. **Fundamentos da Biologia Celular**. 4ed. São Paulo: Artmed, 2017, 884p.

Aquaculture Brasil. **Espécies aquícolas**, 8ed., 2017, p.96-97.

Australian Government. Department of Agriculture and Water Resources. **Report into the cause of White Spot Syndrome Virus outbreak in the Logan River area of Queensland – December 2016**. Commonwealth, Canberra, 2017.

Avnimelech, Y. Bio-filters: the need for a new comprehensive approach. **Aqua-cultural Engineering**, v.34, p.172–178, 2006.

Avnimelech, Y. **Biofloc Technology – A Practical Guide Book**. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, 2009, 182p.

Avnimelech, Y. Intensive production of shrimp. In: **The shrimp book** (ed. by V. Alday-Sanz), UK: Nottingham University Press. 2014, p.233-246.

Bachère, E. Shrimp immunity and disease control. **Aquaculture**, v.191, p.3-11, 2000.

Barracco, M. A. Mecanismo de resistência a doenças em crustáceos. In: Ranzani-Paiva, M.J.T., Takemoto, R.M., Lizama, M.A.P. **Saúde de Organismos Aquáticos**, v.2, p.49-72, 2004.

Biers, E.J., Sun, S., Howard, E.C. Prokaryotic genomes and diversity in surface ocean waters: Interrogating the Global Ocean Sampling metagenome. **Applied and Environmental Microbiology**, n.75, p.2221-2229, 2009.

Borghetti, N.R.B., Ostrensky, A., Borghetti, J.R. Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo. **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**, 2003, 12p.

Boyd, C. Water Quality. In: Lucas, J.S., Southgate, P.C. **Aquaculture, farming aquatic animals and plants**. 2ed. UK: Wiley-Blackwell, 2012, p.52-83.

Boyd, CE. Guidelines for aquaculture effluent management at the farm-level. **Aquaculture**, v.226, p.101-112, 2003.

Bradburry, J.W., Vehrencamp, S.L. **Principles of animal communication**. 2ed. USA: Inc. Publishers, 2011, 697p.

Brady, Y. Viral diseases of fish and shellfish. In: Stickney, R. **Encyclopedia of Aquaculture**. Canada: John Wiley & Sons, 2000, p.949-957.

Brown, E.M., Sadarangani, M., Finlay, B.B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. **Nature Immunology**, v.14, n.7, p.660-667, 2013.

Brusca, R.C., Moore, W., Shuster, S.M. Phylum Arthropoda: Crustacea: crabs, shrimp, and their kin. In:_____. **Invertebrates**. 3ed. USA: Sinauer Associates, 2016, p.761-842.

Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, n.2, p.169-193, 2000.

CABI – **Invasive Species Compendium**, 2007. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/>> Acesso em: 30 nov.2017.

Castex, M., Daniels, C., Chim, L. Probiotics Application in Crustacea. In: Merrifield, D.L., Ringo, E. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. UK: John Wiley & Sons, 2014, p.290-327.
Cato, J.C., Brown, C.L. **Marine ornamental shrimp**. USA: Iowa State Press, 2003, 395p.

CIDASC – Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina. **Relatório das Ações de Prevenção, Controle e Combate à Doença da Mancha Branca dos Crustáceos**. Fevereiro de 2006. 25p.

Chu, J., Hong, N. A., Masuda, C. A., Jenkins, B. V., Nelms, K. A., Goodnow, C. C., Kay, S. A. A mouse forward genetics screen identifies listerin as an E3 ubiquitin ligase involved in neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.106, n.7, p.2097-2103, 2009.

Clark, K. F., Greenwood, S. J., Acorn, A. R., & Byrne, P. J. Molecular immune response of the American lobster (*Homarus americanus*) to the White Spot Syndrome Virus. **Journal of invertebrate pathology**, v.114, n.3, p.298-308, 2013.

Cottin, D., Shillito, B., Chertemps, T., Tanguy, A., Léger, N., Ravaux, J. Identification of differentially expressed genes in the hydrothermal vent shrimp *Rimicaris exoculata* exposed to heat stress. **Marine Genomics**, v.3, n.2, p.71-78, 2010.

Costa, S.W; Fraga, A.P.M.; Zamparetti, A.S.; Marques, M.R.F.; Andreatta, E.R. Presença do vírus da síndrome da mancha branca em crustáceos decápodes silvestres em lagoas costeiras no Sul do Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v.64, n.1, p.209-216, 2012.

Cuéllar-Anjel J., Corteel M., Galli L., Alday-Sanz V. & Hasson K.W. (2014) Principal shrimp infectious diseases, diagnosis and management. In: **The shrimp book** (ed. by V. Alday-Sanz), UK: Nottingham University Press. 2014, p.517-621.

De Schryver, P., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. The basics of bio-flocs technology: the added value for aquaculture. **Aquaculture**, v.277, p.125-137, 2008.

Durand, S.V., Tang, K.F.J. and Lightner, D.V. Frozen commodity shrimp: potential avenue for introduction of White Spot Syndrome Virus and yellow head virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, n.2, v2, p.128-135, 2000.

East, I.J., Black, P.F., Findlay, V., Bernoth, E.M. A national survey to demonstrate freedom from white spot virus and yellow head virus in Australian crustaceans. In: Abstract, **4th Symposium on Aquatic Animal Health**. New Orleans. 2002.

Escobedo-Bonilla, C.M., Alday-Sanz, V., Wille, M., Sorgeloos, P., Pensaert, M.B., Nauwynck, H. J. A review on the morphology, molecular characterization, morphogenesis and pathogenesis of White Spot Syndrome Virus. **Journal of Fish Diseases**, v.31, n.1, p.1-18, 2008.

FAO, NACA, OIE. Asian Diagnostic Guide to Aquatic Animal Disease. **FAO Fisheries Technical Paper**, Rome, n.402, 2001a, 240p.

FAO. Government of Australia expert consultation on good management practices and good legal and institutional arrangements for sustainable shrimp culture. **FAO Fisheries Report**, Rome, n.659, 2001a, 70p.

FAO. Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific. **FAO Fisheries Technical Paper**, n.479, Rome, 2005, 78p.

FAO. GLOBEFISH – Analysis and information on world fish trade, 2015. Disponível em <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/383163/>. Acesso em: 29 jan.2018.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture**, 2016. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>> Acesso em: 20 nov.2017.

Fish, J.D., Fish, S. Arthropoda. In: _____. **A student's guide to the seashore**. 3^aed. UK: Cambridge University Press, 2011. p.298-376.

Flegel, T.W. Update on viral accommodation, a model for host-viral interaction in shrimp and other arthropods. **Developmental & Comparative Immunology**, n.31, p.217-231, 2007.

Flores, E.F (org.). **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007, 888p.

Flores, E.F. Patogenia das infecções víricas. In: _____. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2007b, p.189-235.

Forster, C.F. Bioflocculation in the activated sludge process. **Water S.A**, v.2, p.119-125, 1976.

Fu, L. L., Wang, Y., Wu, Z. C., Li, W. F. In vivo assessment for oral delivery of *Bacillus subtilis* harboring a viral protein (VP28) against White Spot Syndrome Virus in *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.322, p.33-38, 2011.

Ghosh, U., Chakraborty, S., Balasubramanian, T., Das, P. Screening, isolation and optimization of anti-White Spot Syndrome Virus drug derived from terrestrial plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.4, p.S118-S128, 2014.

GOAL (Global Aquaculture Alliance), 2016. Anderson, J.L; Valderrama, D.; Jory, D. Shrimp Production Review. Disponível em: https://www.aquaculturealliance.org/wp-content/uploads/2016/10/GOAL2016_Global-Shrimp-Survey.pdf. Acesso em: 29 jan.2018.

Gross, P., Bartlett, T.C., Browdy, C.L., Chapman, R.W., Warr, G.W. Immune gene discovery by expressed sequence tag analysis of hemocytes and hepatopancreas in the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, and the Atlantic White Shrimp, *L. setiferus*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, n.7, p.565-577, 2001.

Hameed, A. S., Anilkumar, M., Raj, M. S., Jayaraman, K. Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus and its detection in shrimp by immunological methods. **Aquaculture**, v.160, n.1, p.31-45, 1998.

Hameed, A.S.S., Charles, M.X., Anilkumar, M. Tolerance of *Macrobrachium rosenbergii* to White Spot Syndrome Virus. **Aquaculture**, v.183, n.3, p.207-213, 2000.

Hameed, A.S., Yoganandhan, K., Sathish, S., Rasheed, M., Murugan, V., Jayaraman, K. White Spot Syndrome Virus (WSSV) in two species of freshwater crabs (*Paratelphusa hydrodomous* and *P. pulvinata*). **Aquaculture**, v.201, n.3, p.179-186, 2001.

Han F., Zhang X. Characterization of a ras-related nuclear protein (Ran protein) up-regulated in shrimp antiviral immunity. **Fish & Shellfish Immunology** n.23, p.937-944, 2007.

Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, n.1, p.1-21, 1998.

Henry T., Gorvel J.P., Méresse S. Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. **Cellular Microbiology**, n.8, p.23–32, 2006.

Holzapfel, W., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. Overview of gutflora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.85–101, 1998.

Hossain, M., Chakraborty, A., Joseph, B., Otta, S. ., Karunasagar, I., Karunasagar, I. Detection of new hosts for White Spot Syndrome Virus of shrimp using nested polymerase chain reaction. **Aquaculture**, v. 198, n. 1, p. 1-11, 2001.

Huang Z, Li X, Wang L, Shao Z. Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v.1, n.47, p.1737-46, 2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>. Acesso em: 29 jan.2018.

Jory, D., Cabrera, T. Marine Shrimp. In: Lucas, J. S., Southgate, P.C. **Aquaculture: farming aquatic animals and plants**. UK: Blackwell Publishing, 2012. p.476-513.

Ju, Z.Y., Forster, I., Conquest, L., Dominy, W. Enhanced growth effects on shrimp (*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp flocc or flocc fractions to a formulated diet. **Aquaculture Nutrition**, v.14, n.6, p.533-543, 2008.

Karunasagar, I., Karunasagar, I., Alday-Sanz, V. Immunostimulants, probiotics and phage therapy: alternatives to antibiotics. In: **The shrimp book** (ed. by V. Alday-Sanz), UK: Nottingham University Press. 2014, p.695-712.

Kasornchandra, J., Tandavanitj, S., Sahakaro, J., Sriwatanavarunyou, S. The possibility of vertical transmission of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) in *Penaeus monodon*. **Fisheries Science**, v.68, n.sup2, p.1249-1250, 2002.

Kirchman, D.L. Community structure of microbes in natural environments. In:_____. **Process in Microbial Ecology**. Oxford: Oxford University Press, 2012. p.157-176.

Lafferty, K.D., Harvell, C.D., Conrad, J.M., Friedman, C.S., Kent, M.L., Kuris, A.M., Powell, E.N., Rondeau, D. and Saksida, S.M. Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. **Annual Review of Marine Science**, 7, 2015. p.471-496.

Lakshmi, B., Viswanath, B., Gopal, D.V.R.S. Probiotics as antiviral agents in shrimp aquaculture. **Journal of Pathogens**, v.2013, 13p., 2013.

Lauzon, H.L., Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Ringo, E., Davies, S. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. In: Merrifield, D.L., Ringo, E. **Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics**. UK: John Wiley & Sons, 2014, p.169-184.

Leelatanawit, R., Sittikankeaw, K., Yocawibun, P., Klinbunga, S., Roytrakul, S., Aoki, T., Menasveta, P. Identification, characterization and expression of sex-related genes in testes of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.152, n.1, p.66-76, 2009.

Leyva-Madrigal, K. Y., Luna-González, A., Escobedo-Bonilla, C. M., Fierro-Coronado, J. A., Maldonado-Mendoza, I. E. Screening for potential probiotic bacteria to reduce prevalence of WSSV and IHHNV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under experimental conditions. **Aquaculture**, v. 22, p. 6-22, 2011.

Lightner, D.V. Viruses section: introductory remarks. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. **Pathology in Marine Science**. Academic Press, San Diego, USA, p.3-6. 1990.

Lightner, D.V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.106, p.110-130, 2011.

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Tang, K.F.J., Noble, B.L., Schofield, P., Mohny, L.L., Nunan, L.M., Navarro, S.A. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.110, p.174-183, 2012.

Lotz, J.M., Overstreet, R.M., Grimes, D.J. Aquaculture and Animal Pathogens in the Marine Environment with Emphasis on Marine Shrimp Viruses. In: Belkin, S., Colwell, R.R. **Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment**. USA: Springer, 2005, p.431-451.

Lucas, J.S. Introduction. In: Lucas, J.S., Southgate, P.C. **Aquaculture, farming aquatic animals and plants**. 2ed., UK: Wiley-Blackwell, 2012, p.1-17.

Malamud, F. O avanço da aquicultura marinha em águas continentais. **Aquaculture Brasil**, 7ª ed., 2017, p.14-18.

Marques, J.S.; Müller, I.C.; Moser, J.R.; Sincero, T.C.; Marques, M.R.F. Wild captured crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851), a new host

for white spot syndrome virus (WSSV). **Aquaculture**, v.318, p.20-24, 2011

Melchior, F. Ran GTPase cycle: One mechanism—two functions. **Current Biology**, v.11, n.7, p.R257-R260, 2001.

Mendlovic, F.; Conconi, M. Calreticulin: a multifaceted protein. **Nature Educ**, v.4, n.1, p.1, 2010.

Mendoza-Cano, F., Sánchez-Paz, A., Terán-Díaz, B., Galván-Alvarez, D., Encinas-García, T., Enríquez-Espinoza, T., Hernández-López, J. The endemic copepod *Calanus pacificus californicus* as a potential vector of White Spot Syndrome Virus. **Journal of Aquatic Animal Health**, v.26, n.2, p.113-117, 2014.

Merrifield, D.L., Balcázar, J.L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.Z., Hoseinifar, S.H., Ringo, E. Indigenous lactic acid bacteria in fish and crustaceans. In: Merrifield, D.L., Ringo, E. **Aquaculture nutrition: gut health, probiotics, and prebiotics**. UK: Wiley Blackwell, 2014, p.128-168.

Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Bøgwald, J., Castex, M. and Ringø, E. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v.302, n.1, p.1-18. 2010.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 53, de 02 de julho de 2003. Estabelece o Programa Nacional de Sanidade de Animais Aquáticos. **Diário Oficial da União**, 04 jul.2003.

Ministério da Pesca e Aquicultura (atualmente incorporado ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Instrução Normativa nº 04, de 04 de fevereiro de 2015. **Diário Oficial da União**, 09 fev.2015.

Miller, S.A., Harley, J.P. The arthropods: blueprint for success. In: _____. **Zoology**. USA: Mc Graw Hill, 2010, p.228-249.

Moser, J.R.; Álvarez, D.A.G.; Cano, F.M.; Garcia, T.E.; Molina D.E.C.; Clark, G. P.; Marques, M.R.F.; Barajas, F.J.M.; López, J.H. Water temperature influences viral load and detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in *Litopenaeus vannamei* and wild crustaceans. **Aquaculture**, v.326, p.9-14, 2012.

Moyes, C.D., Schulte, P.M. Digestions. In:_____. **Principles of Animal Physiology**. USA: Pearson Benjamin Cummings, 2008, p.526-571.

Müller, I.C. **Genes diferencialmente expressos em camarões de cultivo *Litopenaeus vannamei* infectados pelo vírus da Síndrome da Mancha Branca e genotipagem de isolados geográficos brasileiros do vírus**. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

Musthaq, S.K. S., Kwang, J. Reprint of “Evolution of specific immunity in shrimp – A vaccination perspective against White Spot Syndrome Virus”. **Developmental & Comparative Immunology**, v.48, n.2, p.342-353, 2015.

Muyzer, G., Smalla, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.73, n.1, p.127-141, 1998.

New, M.B., Kutty, M.N. Commercial Freshwater Prawn farming and Enhancement around the Wolrd. In: New, M.B., Valenti, W.C., Tidwell, J.H., D’Abramo, L.R., Kutty, M.N. **Freshwater Prawns Biology and Farming**. UK: Blackwell Publishing, 2010, p. 346-399.

Ng, T.H., Wu, M.H., Chang, S.H., Aoki, T., Wang, H.C. The DNA fibers of shrimp hemocyte extracellular traps are essential for the clearance of *Escherichia coli*. **Developmental & Comparative Immunology**, v.48, n.1, p.229-233, 2015.

Noga, E.J., Hancock, A.L., Bullis, R.A. In: Lewbart, G. A. **Invertebrate Medicine**. USA: Blackwell Publishing, 2006, p.179-193, 327p.

Nunan, L.M.; Poulos, B. T.; Lightner, D.V. The detection of White Spot Syndrome Virus (WSSV) and Yellow Head Virus in imported commodity shrimp. **Aquaculture**, v.160, p.19-30, 1998.

OIE (Office International des Epizooties, França). **Disease distribution maps**. 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/DiseaseDistributionMap?disease_type_hidden=&disease_id_hidden=&selected_disease_name_hidden=&disease_type=1&disease_id_terrestrial=-999&species_t=0&disease_id_aquatic=119&species_a=0&sta_method=semesterly&selected_start_year=2011&selected_report_period=2&selected_start_month=1&date_submit=OK>. Acesso em: 28 nov. 2017.

Overturf, K. Basic Molecular Laboratory Methods. In: _____. **Molecular Research in Aquaculture**. USA: John Wiley & Sons, 2009, p.15-37.

Owens, L. The viral ecology of aquatic crustaceans. In: Hurst, C.J. **Studies in Viral Ecology**. USA: John Wiley & Sons, 2011, v.2, p.177-189.

Pace, B. ., Hawke, J.P., Subramanian, R., Green, C.C. Experimental inoculation of Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii* with White Spot Syndrome Virus (WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v.120, n.2, p.143-150, 2016.

Patat, S.A., Carnegie, R.B., Kingsbury, C., Gross, P.S., Chapman, R., Schey, K.L. Antimicrobial activity of histones from hemocytes of the Pacific white shrimp. **The FEBS Journal**, v.271, n.23-24, p.4825-4833, 2004.

Poersch, L. H., Fóes, G. K., Krummenauer, D., Romano, L. A., Wasielesky, W. Bioflocos: uma alternativa para camarões saudáveis. **Revista Panorama da Aquicultura**, v.22, n.130, p 28-37, 2012.

Pramod.Kiran, R.B., Rajendran, K.V., Jung, S.J., Oh, M.J. Experimental susceptibility of different life-stages of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), to White Spot Syndrome Virus (WSSV). **Journal of Fish Diseases**, v.25, p.201-208, 2002.

Primavera, J.H. Overcoming the impacts of aquaculture on the coastal zone. **Ocean Coast Manage**, v.49, p.531–545, 2006.

Qiao G., Xu D.H., Wang Z., Jang I.K., Qi Z., Zhang M. & Kim, S.K. Comparison of immune response of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after multiple and single infections with WSSV and *Vibrio anguillarum*. **Fish & Shellfish Immunology**, n.44, p.257-264, 2015.

Raja, K., Rahman, M. M., Rajkumar, M., Gopalakrishnan, A., & Vijayakumar, R. Effect of ingestion and waterborne routes under different shrimp densities on White Spot Syndrome Virus susceptibility in three commercially important penaeid shrimps. **Aquaculture Reports**, v.2, p.120-125, 2015.

Reineke, A., Devi, K.U. Genetic fingerprinting techniques for molecular characterization of microbes. In: **Analyzing Microbes: manual of molecular biology** techniques (ed. by D.K. Arora, S. Das, M. Sukumar), Berlin: Springer. 2012, p.37-72.

Rocha, I.P. **Carcinicultura Marinha: realidade mundial e os desafios encontrados pelo Brasil**, ABCCAM, 2016. Disponível em: <http://abccam.com.br/site/wp-content/uploads/2016/01/Carcinicultura-Marinha-Realidade-Mundial-e-os-Desafios-Confrontados-pelo-Brasil-Itamar-Rocha.pdf> Acesso em: 21 nov.2017.

Rout, N, Kumar, S., Jaganmohan, S., Murugan, V. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. **Vaccine**, v.25, n.15, p.2278-2786, 2007.

Ruppert, E.e., Fox, R.S., Barnes, R.D. Crustacea. In:_____. **Invertebrate zoology: a functional evolutionary approach**. 7ed. USA: Thomson Books/Cale. 2004, p.605-701.

- Sánchez-Paz, A. White Spot Syndrome Virus: an overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, v.41, n.46, p.1-34, 2010.
- Seiffert, W.Q., Beltrame, E., Andreatta, E.R., Maggioni, D.S. Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v.16, p.32-38, 2006.
- Selvin, J. Lipton, A.P. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.57, n.1-2, p.147-150, 2003.
- Servin, K. Entrevista concedida a Cecília de Souza Valente. Plymouth, UK. 9 jun.2017.
- Shekar, M., Pradeep, B., Karunasagar, I. White Spot Syndrome Virus: Genotypes, epidemiology and evolutionary studies. **Indian Journal of Virology**, v.23, p.175–183, 2012.
- Smith, V.J., Roulston, C., Dyrinda, E.A. The shrimp immune system. In: **The shrimp book** (ed. by V. Alday-Sanz), UK: Nottingham University Press. 2014, p.89-148.
- Soonthornchai, W., Chaiyapechara, S., Jarayabhand, P., Söderhäll, K., Jiravanichpaisal, P. Interaction of *Vibrio* spp. with the inner surface of the digestive tract of *Penaeus monodon*. **PLoS one**, v.10, n.8, p.e0135783, 2015.
- Soto, M.A., Lotz, J.M. Epidemiological parameters of White Spot Syndrome Virus infections in *Litopenaeus vannamei* and *L. setiferus*. **Journal of Invertebrate Pathology**, n.78, p.9-15, 2001.
- Souza, T.M. **Detecção do vírus da mancha branca (WSV) em *Litopenaeus vannamei* por métodos de diagnóstico moleculares: hibridização *in situ* e PCR em tempo real**. 2008. 46f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- Stentiford, G.D., Bonami, J.R., Alday-Sanz, V. A critical review of susceptibility of crustaceans to Taura Syndrome, Yellowhead Disease

and White Spot Disease and implications of inclusion of these diseases in European legislation. **Aquaculture**, v.291, p.1–17, 2009.

Sutthangkul, J., Amparyup, P., Charoensapsri, W., Senapin, S., Phiwaiya, K., Tassanakajon, A. Suppression of shrimp melanization during White Spot Syndrome Virus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v.290, n.10, p.6470-6481, 2015.

The World Bank, FAO. **Fish to 2030 - Prospects for Fisheries and Aquaculture**, 2013. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/019/i3640e/i3640e.pdf>> Acesso em: 26 nov.2017.

Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. **Aquaculture**, v.203, p.263-278, 2002.

Tuyen, N. X., Verreth, J., Vlak, J. M., & De Jong, M. C. M. Horizontal transmission dynamics of White Spot Syndrome Virus by cohabitation trials in juvenile *Penaeus monodon* and *Penaeus vannamei*. **Preventive Veterinary Medicine**, v.117, n.1, p.286-294, 2014.

Tzeng, T. D., Pao, Y. Y., Chen, P. C., Weng, F. C. H., Jean, W. D., Wang, D. Effects of host phylogeny and habitats on gut microbiomes of oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*). **PloS one**, v.10, n.7, p.e0132860, 2015.

Urakawa, H., Rivera, I.N. Aquatic Environment. In: Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. **The biology of Vibrios**. ASM Press: USA. 2006. p.175-189.

Verbruggen, B., Bickley, L. K., van Aerle, R., Bateman, K. S., Stentiford, G. D., Santos, E. M., & Tyler, C. R. Molecular mechanisms of White Spot Syndrome Virus infection and perspectives on treatments. **Viruses**, v.8, n.1, p.23, 2016.

Vidya, R., Gireesh-Babu, P., Prasad, K. P. White Spot Syndrome Virus manipulates ubiquitin gene expression in *Penaeus monodon*. **Indian Journal of Virology**, v.24, n.1, p.82-84, 2013.

Vieira, F.N., Buglione Neto, C.C., Mouriño, J.L.P., Jatobá, A., Ramirez, C., Martins, M.L., Barracco, M.A.A.M. and Vinatea, L.A. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.6, p.763-769, 2008.

Wang, W., Zhang, X., Comparison of antiviral efficiency of immune responses in shrimp. **Fish and Shellfish Immunology**, v.25, n.5, p.522–527, 2008.

Wang X.W., Xu Y.H., Xu J.D., Zhao X.F., Wang J.X. Collaboration between a soluble C-type lectin and calreticulin facilitates White Spot Syndrome Virus infection in shrimp. **The Journal of Immunology**, v.193, n.5, p.2106-2117, 2014.

Wang, Y.G., Hassan, M.D., Shariff, M., Zamri, S.M., Chen, X. Histopathology and cytopathology of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in cultured *Penaeus monodon* from peninsular Malaysia with emphasis on pathogenesis and the mechanism of white spot formation. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.39, n.1, p.1-11, 1999.

Wang, Y.G., Lee, K.L., Najiah, M., Shariff, M., Hassan, M.D. A new bacterial white spot syndrome (BWSS) in cultured tiger shrimp *Penaeus monodon* and its comparison with white spot syndrome (WSS) caused by virus. **Diseases of Aquatic Organisms**, v.41, n.1, p.9-18, 2000.

Ward, T.M., Hoedt, F., McLeay, L., Dimmlich, W.F., Kinloch, M., Jackson, G., McGarvey, R., Rogers, P.J. and Jones, K.. Effects of the 1995 and 1998 mass mortality events on the spawning biomass of sardine, *Sardinops sagax*, in South Australian waters. **ICES Journal of Marine Science**, v.58, n.4, p.865-878, 2001.

Wasielesky, W, Atwood, H., Stokes, A., Browdy, C.L. Effect of natural production in a zero exchange suspended microbial floc based super-intensive culture system for white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v.258, p.396-403, 2006.

Wilson, K., Blitchington, R. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2273–2278, 1996.

Wit, R., Bouvier, T. ‘Everything is everywhere, but, the environment selects’, what did Baas Becking and Beijerinck really say?. **Environmental microbiology**, v.8, n.4, p. 755-758, 2006.

Witteveldt, J., Cifuentes, C.C., Vlak, J.M., Van Hulten, C.W. Protection of *Penaeus monodon* against White Spot Syndrome Virus by oral vaccination. **Journal of Virology**, v.78, n.4, p.2057-2061, 2004.

Zhao, P., Huang, J., Wang, X. H., Song, X. L., Yang, C. H., Zhang, X. G., & Wang, G. C. The application of bioflocs technology in high-intensive, zero exchange farming systems of *Marsupenaeus japonicus*. **Aquaculture**, v. 354, p. 97-106, 2012.

Zhao, Z, Jiang, C, Zhang, X. Effects of immunostimulants targeting Ran GTPase on phagocytosis against virus infection in shrimp. **Fish & Shellfish Immunology**, v.31, n.6, p.1013-1018, 2011.

APÊNDICE

Apêndice I - Parâmetros de qualidade de água monitorados durante o período de aclimação (15 dias). Camarões *Litopenaeus vannamei* foram mantidos em água clara ou em bioflocos. Média, \pm desvio padrão e nível de significância.

Parâmetro	Água clara	Bioflocos	P
Temperatura (°C)	27,8 \pm 0,8 (26,3-29,6) ^a	30,2 \pm 1,4 (28,7-33,4) ^b	**
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	6,4 \pm 0,5 (5,4-7,6) ^a	5,9 \pm 0,4 (5,1-6,7) ^b	**
Sólidos suspensos totais (mg.L ⁻¹)	-	452,7 \pm 44,4 (387-511)	-
Alcalinidade (mg.L ⁻¹)	124 \pm 6,3 (116-132)	148 \pm 22,9 (112-176)	NS
Salinidade (ppt)	31,6 \pm 0,6 (31-32,5)	31,1 \pm 1,4 (29,6-33,6)	NS
pH	7,7 \pm 0,0 (7,7-7,8)	7,5 \pm 0,1 (7,4-7,6)	NS
Turbidez (UNT)	1,2 \pm 0,2 (1,1-1,6) ^a	130,9 \pm 36,8 (76,1-175,3) ^b	**
Amônia (mg.L ⁻¹)	0,2 \pm 0,1 (0,1-0,3)	0,1 \pm 0,0 (0,0-0,2)	NS
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0,0 \pm 0,0 ^a	0,5 \pm 0,3 (0,0-1,0) ^b	*
Nitrato (mg.L ⁻¹)	2,6 \pm 1,2 (0,7-4,2)	35,5 \pm 30,8 (15,9-88,9)	**
Fosfato (mg.L ⁻¹)	0,9 \pm 0,1 (0,6-1,0) ^a	2,0 \pm 0,4 (1,4-2,6) ^b	**

Médias obtidas a partir de registros realizados duas vezes por dia para os parâmetros temperatura e oxigênio dissolvido; demais parâmetros foram registrados duas vezes por semana. NS: não significativo; *: P < 0.05; **: P < 0.01.

ANEXO

Anexo I – Níveis de garantia da ração fornecida aos camarões durante a fase experimental deste trabalho. Ração extrusada Potimar 35 EXT (Guabi®). Indicada para cultivos intensivos durante fase de engorda.

Umidade (máximo)	10%
Proteína bruta (mínimo)	35%
Extrato etéreo (mínimo)	7,50%
Fibra bruta (máximo)	5%
Matéria mineral (máximo)	13%
Cálcio (máximo)	3%
Fósforo (mínimo)	1,45%
Vitamina A (UI)	4000
Vitamina D3 (UI)	2000
Vitamina E (UI)	150
Vitamina C (UI)	130
Selênio mineral (mg/kg)	0,3

Fonte: Guabi. **Folheto Potimar Anti-stress**. 2011. Disponível em: <https://issuu.com/guabi/docs/folheto-potimar-anti-stress>. Acesso em: 01 abr.2018.