



Instituto Federal Catarinense

Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal

Campus Araquari

Alex Silva Marquezi

Efeito da suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. sobre a resposta imune e a resistência ao desafio com vírus-da-mancha-branca associado ao estresse térmico de camarões-brancos-do-pacífico

Araquari

2023

Alex Silva Marquezi

Efeito da suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. sobre a resposta imune e a resistência ao desafio com vírus-da-mancha-branca associado ao estresse térmico de camarões-brancos-do-pacífico

Dissertação apresentada ao Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense – Campus Araquari, para obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Delano Dias Schleder

Araquari

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

M357e

Marquezi, Alex

Efeito da suplementação dietética de
Aurantiochytrium sp. sobre a resposta imune e a
resistência ao desafio com vírus-da-mancha-branca
associado ao estresse térmico de camarões-brancos-do-
pacífico / Alex Marquezi; orientador Delano Schleder.
-- Araquari, 2023.
40 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal
Catarinense, campus Araquari, Araquari, 2023.

Inclui referências.

1. aditivo. 2. Penaeus vannamei. 3. doença da
mancha branca. 4. suplementação alimentar. 5. dieta
de inverno. I. Schleder, Delano. II. Instituto
Federal Catarinense. . III. Título.

Alex Silva Marquezi

Efeito da suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. sobre a resposta imune e a resistência ao desafio com vírus-da-mancha-branca associado ao estresse térmico de camarões-brancos-do-pacífico

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 18/08/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Delano Dias Schleder (Orientador)

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituição de vínculo: Instituto Federal Catarinense (IFC- Campus Araquari)

Prof. Dr. Giovanni Lemos de Mello

Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituição de vínculo: Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC)

Prof^a. Dra. Scheila Anelise Pereira Dutra

Doutora em Aquicultura pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituição de vínculo: Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)



Emitido em 18/08/2023

DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI Nº 10/2023 - PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 13:05)

DELANO DIAS SCHLEDER

PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO

CGET/ARAQ (11.01.02.08)

Matricula: ###133#8

(Assinado digitalmente em 20/09/2023 19:57)

IVAN BIANCHI

COORDENADOR DE CURSO

PGPSA/ARAQ (11.01.02.22)

Matricula: ###489#1

Visualize o documento original em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **10**, ano: **2023**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI**, data de emissão: **20/09/2023** e o código de verificação: **2c465d57e8**

Dedico este trabalho a minha família.

Agradecimentos

Ao Instituto Federal Catarinense (campus Araquari), em especial ao meu orientador Prof. Delano Dias Schleder por toda dedicação e paciência durante essa trajetória.

A Prefeitura Municipal de Araquari por permitir e incentivar meu processo de capacitação profissional.

A minha esposa, Francine Brinkmann Castanho por todo carinho e companheirismo durante esta etapa da minha vida.

Ao meu filho, Eduardo Castanho Marquezi por ser a minha eterna fonte de inspiração.

A memória do meu pai, Roberto Marquezi.

A minha Mãe, Miriam Regina da Silva Marquezi por todo amor e dedicação.

Aos integrantes do Laboratório de aquicultura (LAq- IFC) que contribuíram de forma direta para execução do experimento: Sabrina Dolzan, Beatris Rosalina Michels, Maria Eduarda da Costa, Maria Eduarda de Sousa Henriques, Maisa Borges dos Santos.

Aos parceiros do Laboratório de Camarão Marinho (LCM- UFSC), em especial ao Prof. Dr. Felipe do Nascimento Vieira, Dra. Jaqueline da Rosa Coelho e a doutoranda Flávia Banderó Hoffling, por toda atenção e profissionalismos durante a execução do experimento.

O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano

(Isaac Newton)

Resumo

MARQUEZI, Alex Silva. **Efeito da suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. sobre a resposta imune e a resistência ao desafio com vírus-da-mancha-branca associado ao estresse térmico de camarões-brancos-do-pacífico.** 2023. 40 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2023.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a resistência e os parâmetros hemato-imunológicos do *Penaeus vannamei* diante do desafio do vírus da mancha branca (WSSV) associado ao estresse térmico, após a suplementação alimentar com 0, 1, 2, 3 e 4% de inclusão de *Aurantiochytrium* sp. Os camarões foram criados em tanques de 400 L em triplicata, durante o período de 63 dias em temperatura subótima (22°C), em sistema de água clara. Os animais foram alimentados quatro vezes ao dia, e a quantidade de ração foi calculada através da tabela de Van Wyk e Scarpa (1999). O desafio com WSSV ocorreu concomitante ao desafio do estresse térmico, onde 14 animais por tratamento foram transferidos para tanques de 50 L, aclimatados por 48h (22°C), e então infectados oralmente, via gavagem, com carga viral total de $2,6 \times 10^6$ por grama de animal. Após a infecção, os camarões foram mantidos por 108 h (4,5 dias) sob temperatura subótima (22°C), seguidos por 12 h de elevação da temperatura até atingir 28 °C ($0,5 \text{ °C h}^{-1}$) e mais 48 h sob temperatura ótima (28°C), totalizando 7 dias. A mortalidade foi monitorada a cada 3h ao longo de toda infecção associado ao estresse térmico. As amostras de hemolinfa foram coletadas antes e 96 h e 168 h após a infecção viral associado ao estresse de temperatura. Os dados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade, para atender os requisitos da ANOVA fatorial e MANOVA. Os tratamentos com suplementação de 3% e 4% de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram menor mortalidade durante o período sob temperatura subótima e ao final do ensaio do desafio viral associado ao estresse térmico apenas o nível de 4% resultou em menor mortalidade ($p < 0,5$). Os parâmetros hemato-imunológicos foram afetados principalmente pela infecção e pelo estresse térmico, com poucas diferenças entre os tratamentos. Ao utilizar a análise multivariada para avaliar os diferentes parâmetros e condições, observou-se que o tratamento controle durante o período sob temperatura de 22°C diferiu dos demais tratamentos, em decorrência do expressivo aumento da mortalidade neste período, bem como dos reflexos sobre a atividade da PO e do título de aglutinação. Deste modo, os resultados sugerem que a suplementação de *Aurantiochytrium* sp., em particular o nível de 4%, pode ser benéfica para produção de camarões sob temperatura subótima e na mitigação tanto dos efeitos de estresses por variação térmica quanto da infecção viral.

Palavras-chave: aditivo; *Penaeus vannamei*; doença da mancha branca; suplementação alimentar; dieta de inverno.

Abstract

MARQUEZI, Alex Silva. **Effects of dietary microalgae supplementation on immune response and resistance to white spot virus challenge associated with heat stress in Pacific white shrimp raised at suboptimal temperature.** 2023. 40 f. Dissertation (Master degree in Science) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Araquari, 2023.

This study aimed to evaluate the resistance and the hemato-immunological parameters of the *Penaeus vannamei* to the white spot syndrome virus (WSSV) challenge associated with thermal stress, after food supplementation with 0, 1, 2, 3 and 4% of *Aurantiochytrium* sp. inclusion. The shrimps were raised in 400L tanks, in triplicate, over a period of 63 days under suboptimal temperature (22°C), in a clear water system. The animals were fed four times a day and the amount of feed was calculated by Van Wyk and Scarpa's (1999) table. The WSSV challenge occurred simultaneously with the heat stress challenge, where 14 animals per treatment were transferred to 50 L tanks, acclimatized for 48 h (22°C), and then infected orally, via gavage, with a total viral load of 2.6×10^6 per animal gram. After infection, the shrimp were kept for 108 h (4.5 days) at suboptimal temperature (22°C), followed by 12h of temperature elevation until reaching 28 °C (0.5 °C h⁻¹) and 48 h more at optimum temperature (28°C), totaling 7 days. The mortality was monitored every 3 h throughout the infection associated with heat stress. Hemolymph samples were collected before and 96 h and 168 h after viral infection associated with temperature stress. Data were tested for normality and homogeneity to meet the requirements of factorial ANOVA and MANOVA. Treatments with 3% and 4% *Aurantiochytrium* sp. showed lower mortality during the period under suboptimal temperature and at the end of the viral challenge assay associated with heat stress, only the 4% level resulted in lower mortality ($p < 0.5$). Hemato-immunological parameters were mainly affected by infection and heat stress, with few differences between treatments. When using multivariate analysis to evaluate the different parameters and conditions, it was observed that the control treatment during the period under a temperature of 22°C differed from the other treatments, due to the significant increase in mortality during this period, as well as the effects on the PO activity and agglutination titer. Thus, the results suggest that *Aurantiochytrium* sp. supplementation, in particular the 4% level, can be beneficial for shrimp production under suboptimal temperatures and in mitigating both the effects of stress due to thermal variation and viral infection.

Keywords: additive; *Penaeus vannamei*; White spot syndrome; feed additive; winter diet.

Lista de Figuras

Figura 1	Produção brasileira de camarão marinho cultivado por estado.....	15
Figura 2	Imagem microscópica do <i>Aurantiochytrium</i> sp.....	19
Figura 3	Gráfico da análise de agrupamento centroide com base na análise de variância e covariância multivariada, considerando os dados de mortalidade e parâmetros hemato-imunológicos de <i>P. vannamei</i> alimentado com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de <i>Aurantiochytrium</i> sp. após a infecção com WSSV nas temperaturas 22 °C e 28 °C, incluindo o grupo controle negativo da infecção viral (CN).....	31

Lista de Tabelas

Tabela 1	Dietas experimentais utilizadas na engorda e no desafio da infecção viral do <i>P. vannamei</i> em sistema de água clara em temperatura subótima	24
Tabela 2	Composição de ácidos graxos nas dietas (%)	24
Tabela 3	Mortalidade cumulativa final (%) de camarões <i>P. vannamei</i> alimentados com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de <i>Aurantiochytrium</i> sp. após a infecção com WSSV associada ao estresse térmico	28
Tabela 4	Parâmetros hemato-imunológicos de camarões <i>P. vannamei</i> alimentado com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de <i>Aurantiochytrium</i> sp. nos três períodos: antes da infecção viral (22°C), 4,5 dias após a infecção com WSSV (22°C) e 7 dias após a infecção viral (28°C).....	30

Lista de Abreviaturas e Siglas

CTH	Contagem total de hemócitos
DHA	Ácido docosahexaenóico
DSW	Doença da mancha branca
EPA	Ácido eicosapentaenóico
Laq/IFC	Laboratório de Aquicultura/ Instituto Federal Catarinense
LCM/UFSC	Laboratório de Camarões Marinho/ Universidade Federal de Santa Catarina
LC-PUFA	Ácido graxo poliinsaturado de cadeia longa
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
PO	Atividade da fenoloxidase
SFA	Ácidos graxos saturado
SPF	Livre de patógenos específicos
WSSV	Vírus da síndrome da mancha branca

Lista de Símbolos

<	Menor	±	Mais ou menos
>	Maior	ppm	Parte por milhão
®	Marca registrada	mg	Miligrama
%	Porcentagem	mM	Milimolar
°C	Grau Celsius	min	Minuto
t	Tonelada	mL	Mililitro
β	Beta	μL	Microlitro
μm	Micrômetro	Nm	Nanomolar
h	Hora	W	Watt
g	Gramma	dl	Decilitro
L	Litro	m ³	Metro cúbico
U	Unidade de Atividade enzimática		

SUMÁRIO

1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	14
1.1. Panorama da carcinicultura.....	14
1.2. Estresse térmico	15
1.3. Doença da Mancha Branca (DMB).....	16
1.4. Suplementação com Microalga.....	17
2. OBJETIVOS.....	20
2.1. Objetivo Geral.....	20
2.2. Objetivo Específico	20
3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE <i>Aurantiochytrium</i> sp. SOBRE A RESPOSTA IMUNE E RESISTÊNCIA AO DESAFIO COM VÍRUS-DA-MACHA-BRANCA ASSOCIADO AO ESTRESSE TÉRMICO DE CAMARÕES-BRANCOS-DO-PACÍFICO	21
3.1. Introdução.....	21
3.2. Materiais e métodos.....	23
3.2.1. Material biológico	23
3.2.2. Formulação das dietas e manejo alimentar.....	23
3.2.3. Delineamento experimental.....	25
3.2.4. Coleta de material e análises laboratoriais.....	26
3.2.5. Análise estatística	27
3.3. Resultados.....	28
3.4. Discussão	31
3.5. Conclusão	34
4. REFERÊNCIAS	35

1. CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

1.1. Panorama da carcinicultura

A aquicultura tem sido o setor de alimentos que mais se expandiu contribuindo significativamente para a segurança alimentar mundial (HOSEINIFAR; DADAR; RINGØ, 2017), mesmo em meio a disseminação mundial da pandemia do COVID-19 a produção aquícola manteve sua tendência de crescimento, com uma produção mundial de 122,6 milhões de toneladas, com acréscimo de 2,7% em relação ao ano anterior (FAO, 2022). Tal fato, contribui para o aumento na procura por commodities de produtos aquícolas, impulsionando o setor produtivo.

Dentre os segmentos da aquicultura, a carcinicultura constitui uma valiosa e essencial fonte de proteína para o consumo humano. A atividade apresentou um crescimento de 8,99% ao ano entre o período de 2016 a 2020, sendo o cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Penaeus vannamei*) responsável por 83% da produção mundial (FAO, 2022). Consolidando assim, sua importância no mercado, como uma espécie de alto valor econômico, com alta taxa de crescimento e com tolerância a diferentes concentrações de salinidade (BRAY; LAWRENCE; LEUNG-TRUJILLO, 1994; SAOUD; DAVIS; ROUSE, 2003).

No Brasil, a carcinicultura teve um bom momento no início da década de 2000, atingindo seu auge no ano de 2003, com uma produção de 90.190 toneladas de camarão, das quais quase 80% destinaram-se ao mercado internacional. Já em 2004, a produção da carcinicultura brasileira reduz para 75.904 toneladas. Inclusive, esse declínio se iniciou com a aplicação da lei antidumping imposta pelos Estados Unidos contra os camarões produzidos no Brasil, aliado ao surto de enfermidades, em particular a Doença da Mancha Branca (DMB) e a Doença da Mionecrose Infecciosa, e à progressiva desvalorização do real em relação ao dólar, que contribuiu para uma real perda da competitividade no nosso produto no tocante a outrora pujante e expressiva participação no mercado internacional, reduzindo drasticamente as suas exportações (ABCC, 2022a).

A carcinicultura brasileira ainda continua lutando contra os empecilhos que recorrentemente teimam em lhe desafiar, depois de sua pior fase em 2016 (60.000 t), recuperou sua capacidade produtiva, e apresentou um crescimento de 100% na

produção em 2021 (120.000 t), conforme demonstrado na figura 1 (ABCC, 2022b). Devido às condições ambientais favoráveis, os cultivos concentraram-se majoritariamente na região nordeste, representando mais de 99% da produção nacional (ABCC, 2022b).

Figura 1 – Produção Brasileira de camarão marinho cultivado por estado.

ESTADOS	PRODUÇÃO (toneladas)					
	2016	2017	2018	2019	2020	2021
CEARÁ	34.000	30.000	29.000	35.000	47.000	55.600
RIO GRANDE DO NORTE	15.000	19.500	23.000	26.000	28.000	26.000
PARAÍBA	2.000	2.400	6.000	7.000	8.100	10.000
PERNAMBUCO	2.200	3.200	5.500	6.500	8.000	8.500
BAHIA	2.500	3.400	5.600	5.800	7.000	6.000
SERGIPE	2.000	3.200	5.000	6.000	7.000	6.000
PIAUÍ	1.500	1.800	1.600	1.700	3.500	4.000
ALAGOAS	400	630	700	1.200	2.500	2.900
OUTROS (MA, SC, PR, PA, SP, RS, RJ, GO, TO, MG)	400	870	600	800	900	1.000
Produção Total	60.000	65.000	77.000	90.000	112.000	120.600

Fonte: ABCC, 2022b.

Diante do exposto, fica evidente a pouca participação da região sul no panorama nacional da carcinicultura, como exemplo o estado de Santa Catarina, que já teve sua produção superior a 4 mil t em 2004 (MELLO, 2021), recentemente produziu apenas 80 t (IBGE, 2020), atestando as dificuldades encontradas para produção do *Penaeus vannamei* nas regiões subtropicais devido as baixas temperaturas, principalmente no inverno e outono (PENG et al., 2018).

1.2. Estresse térmico

A temperatura ideal para a criação do *Penaeus vannamei* é de 28 a 32°C (VAN WYK; SCARPA, 1999), porém no estado de Santa Catarina é comum ocorrer oscilações térmicas, com quedas repentinas na temperatura, principalmente durante os períodos de outono, inverno e primavera, representando um grande desafio para o desenvolvimento da carcinicultura na região. Os camarões são organismos ectotérmicos, por isso quando submetidos a baixas temperaturas apresentam redução

em seu desempenho (ZEIN-ELDIN; GRIFFITH, 1966), comprometendo sua capacidade de crescimento e sobrevivência (ABDELRAHMAN; ABEBE; BOYD, 2019).

Sob o frio acontece uma série de mudanças fisiológicas e metabólicas danosas a manutenção da homeostase corporal dos animais, como: a diminuição da fluidez das membranas, que dificulta o transporte transmembranar comprometendo o fluxo de nutrientes e o processo de sinalização celular (HAYWARD; MANSO; COSSINS, 2014), interferindo no metabolismo proteico (FAN; WANG; WANG, 2019) e energético (JIA et al., 2018). Quando os camarões são expostos ao frio, uma das respostas mais conhecida é o aumento dos ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios que compõem suas membranas, conferindo a elas uma maior fluidez, conhecida como “adaptação da homeoviscosidade” (COSSINS, 1983). Essa modificação na composição das membranas é uma resposta de autopreservação, na tentativa de manter a integridade celular de possíveis injúrias (LEE JR et al., 2006).

O estresse térmico induzido pelo frio, também desencadeia a supressão do sistema imune, com diminuição do número de hemócitos circulantes, ocasionando um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a defesa de mecanismos antioxidantes (FAN; WANG; WU, 2013), além de provocar alterações no perfil da microbiota intestinal (LIU et al., 2019), influenciando dessa forma negativamente a imunidade do camarão, servindo de gatilho para o aparecimento de doenças, como a DMB (DEY et al., 2020).

1.3. Doença da Mancha Branca (DMB)

A DMB é historicamente a doença mais devastadora na indústria do camarão, acarretando perdas globais superiores a US\$ 3 bilhões ao ano (MILLARD et al., 2021), podendo levar a mortalidade de até 100% em 3 a 10 dias (LI; WENG; HE, 2019). Os animais acometidos pela doença podem apresentar letargia, redução de consumo, afrouxamento da cutícula, baixa resposta a estímulos, descoloração do hepatopâncreas, coagulação retardada da hemolinfa e manchas brancas calcificadas sobre o exoesqueleto (DEY et al., 2020). A DMB também afeta a população de camarões selvagens (CAVALLI et al., 2010), sendo o vírus aquático mais notório de camarões, com mais de 93 espécies de hospedeiros e/ ou portadores (SÁNCHEZ-PAZ, 2010). O Vírus da

Mancha Branca (WSSV) é o único membro do gênero *Whispovirus* da família *Nimaviridae* (LIANG et al., 2015).

A DMB encontra-se presente na lista das doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), justamente por apresentar uma rota complexa de transmissão e infecção, não existindo até o presente momento nenhum tratamento terapêutico disponível (LIU et al., 2021). Como medida alternativa de controle, utiliza-se a aquisição de pós-larvas livre de patógenos específicos (SPF), associado ao emprego de técnicas de manejo e de medidas de biossegurança (DEY et al., 2020).

A ocorrência ou não, ou a maior e menor intensidade, dos surtos de doença da mancha branca estão intrinsecamente relacionados com a interação entre o ambiente e o patógeno, dessa forma durante os períodos de estresse térmico os camarões tornam-se mais suscetíveis a presença de novos surtos (MILLARD et al., 2021). Neste sentido, a suplementação dietética com ingredientes ou aditivos funcionais ou imunomoduladores constitui umas das alternativas viáveis na prevenção de doenças e equilíbrio da homeostase corporal (ABDEL-RAHIM et al., 2021; GHAEDNIA et al., 2011; MEENAKSHI et al., 2019).

1.4. Suplementação com *Aurantiochytrium* sp.

Os traustocitrídeos são organismos marinhos que foram classificados pela primeira vez como fungo devido à sua capacidade de produzir zoósporos e desenvolver estruturas semelhantes a rizóides. Estes foram posteriormente reclassificados em Stramenophiles, na classe Labyrinthulomycetes, compreendendo o gênero *Aurantiochytrium* sp. (PRABHAKARAN et al., 2022).

O protista marinho *Aurantiochytrium* sp. é um organismo heterotrófico (GUPTA; BARROW; PURI, 2012), com capacidade de liberar zoósporos de forma semelhante as células vegetativas (MARCHAN et al., 2018). A literatura também refere-se a este protista como uma microalga o que pode ocasionar divergências quanto a sua classificação e taxonomia (GUIMARÃES et al., 2019; K. V. et al., 2021).

A utilização de *Aurantiochytrium* sp. como aditivo alimentar para organismos aquáticos ganhou uma atenção significativa nos últimos anos, devido a seus compostos

bioativos e seus efeitos benéficos para uso na aquicultura (GUIMARÃES et al., 2019), sendo cooptado até mesmo como fonte alternativa ao uso do óleo de peixe nas formulações dietéticas para organismos aquáticos, o que pode diminuir a dependência das fábricas de rações de recursos naturais (CHAUTON et al., 2015).

O microrganismo *Aurantiochytrium* sp. é capaz de produzir vários produtos bioativos incluindo o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e outros ácidos graxos essenciais (YANG et al., 2022), destacando-se por sua elevada concentração de DHA (MARCHAN et al., 2018). Além de produzir também carotenoides e esqualeno (WATANABE et al., 2018). O extrato de *Aurantiochytrium* sp. adicionado em dietas para peixes possui a capacidade de modular a atividade da lipase, melhorar a síntese lipídica e diminuir o dano oxidativo causado pela peroxidação lipídica, além de influenciar o metabolismo hepático, a proliferação celular, a motilidade e a transdução de sinais (YANG et al., 2022).

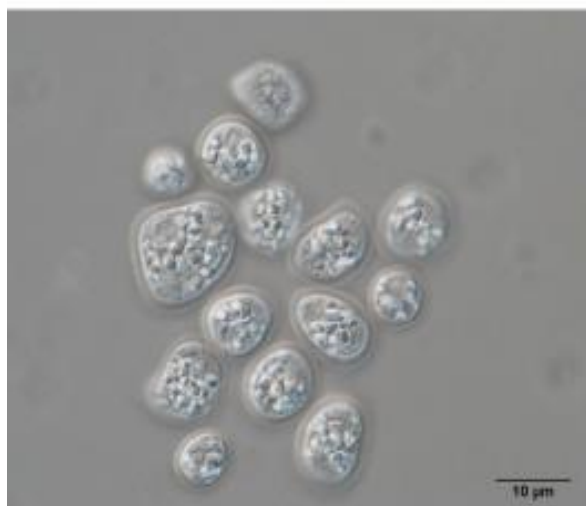
Como os camarões peneídeos possuem uma capacidade limitada de sintetizar ácidos graxos altamente insaturados, tornam-se essencialmente dependentes da oferta dietética, e seu enriquecimento na dieta já demonstrou um papel benéfico apreciado na resistência ao estresse e na defesa imunológica do camarão (MERCIER et al., 2009). A inclusão de *Aurantiochytrium* sp. na dieta de *P. vannamei* incrementou a taxa de crescimento específico, a conversão alimentar, e foi capaz de promover um aumento no perfil de ácidos graxos do tecido muscular, em especial no nível de DHA (GUIMARÃES et al., 2019; WANG et al., 2017), promovendo uma melhora da qualidade nutricional, devido ao aumento dos ácidos graxos da série n-3 (KUMAR et al., 2018).

O incremento de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (LC-PUFAs - do inglês *long-chain polyunsaturated fatty acids*) pode aumentar a fluidez da membrana (CHOWANSKI et al., 2015), configurando um importante mecanismo na resistência à baixas temperaturas. A importância da adição de LC-PUFA na dieta de tilápias em condições de baixas temperaturas já foi demonstrada por CORRÊA et al. (2018), com aumento dos níveis de insaturação dos ácidos graxos nos fosfolípidios que compõem suas membranas celulares (WEBER; BOSWORTH, 2005), melhorando a fluidez das membranas, facilitando o transporte de nutrientes e os processos de sinalização celular.

Neste sentido, a suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. pode ser uma interessante ferramenta para modular positivamente a funcionalidade das membranas,

bem como induzir diferentes respostas imunológicas contra o estresse pelo frio (ZHOU et al., 2017; SHAH et al., 2018). O trabalho realizado por NOBREGA et al. (2019) em tilápias mantidas em condições de temperatura subótima e suplementadas com *Aurantiochytrium* sp. resultou na melhoria da eficiência alimentar, no crescimento e na composição lipídica corporal (NOBREGA et al., 2019). Em peixes a suplementação da microalga também ocasionou aumento no número de células imunológicas, com melhora da imunidade e da capacidade de resistir a doenças (Li et al., 2021). Com isso, acredita-se que a suplementação dos camarões com *Aurantiochytrium* sp. em condições de temperatura subótima e associado a flutuações térmicas, possa modular positivamente a resposta imune e a sobrevivência dos camarões no enfrentamento ao WSSV.

Figura 2- Imagem microscópica do *Aurantiochytrium* sp.



(K.V. et al., 2018)

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Fornecer subsídios para o desenvolvimento de uma dieta que auxilie no enfrentamento das baixas temperaturas na criação de camarão-branco-do-pacífico (*Penaeus vannamei*) a partir do uso da *Aurantiochytrium* sp. como aditivo.

2.2. Específicos

➤ Determinar a sobrevivência de camarões alimentados com dietas contendo diferentes níveis de *Aurantiochytrium* sp. e criados em temperatura subótima (22°C), após o desafio experimental com vírus-da-mancha-branca (WSSV) associado ao estresse térmico.

➤ Avaliar o efeito nos parâmetros hemato-imunológicos da inclusão de diferentes níveis de *Aurantiochytrium* sp. na dieta de camarões criados em temperatura subótima (22°C), após o desafio experimental com vírus-da-mancha-branca (WSSV) associado ao estresse térmico.

3. EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA DE *Aurantiochytrium* sp. SOBRE A RESPOSTA IMUNE E A RESISTÊNCIA AO DESAFIO COM VÍRUS-DA-MANCHA-BRANCA ASSOCIADO AO ESTRESSE TÉRMICO DE CAMARÕES-BRANCOS-DO-PACÍFICO

Alex Silva Marquezí¹, Flávia Banderó Hoffing² Sabrina Dolzan⁴, Maria Eduarda da Costa⁴, Maria Eduarda de Souza Henriques⁴, Beatris Rosalina Michels⁵, Delano Dias Schleder³

¹Médico veterinário, discente do Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal - Instituto Federal Catarinense, Araquari, Santa Catarina, Brasil. ²Doutoranda em aquicultura – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. ³Doutor, docente do Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal - Instituto Federal Catarinense, Araquari, Santa Catarina, Brasil. ⁴Bolsista, discente de graduação do Curso de Medicina Veterinária - Instituto Federal Catarinense, Araquari, Santa Catarina, Brasil. ⁵Discente do Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal - Instituto Federal Catarinense, Araquari, Santa Catarina, Brasil

3.1. Introdução

O crescimento da população mundial associado ao maior poder de compra culminou na maior busca por produtos de origem animal, incluindo os camarões marinhos (MILLARD et al., 2021). Conseqüentemente, o cultivo do camarão-branco-do-pacífico (*Penaeus vannamei*) atingiu a produção de 5,8 milhões toneladas, sendo a espécie mais produzida (FAO, 2022), alcançando cerca de 90% dos cultivos (RAHARDJO et al., 2022).

O processo de intensificação dos sistemas de produção facilitou o aparecimento de doenças, como o vírus da síndrome da mancha branca (WSSV, do inglês *White Spot Syndrome Virus*), sabe-se que o aparecimento desses surtos está cada vez mais associado às mudanças nas condições ambientais que podem desencadear o estresse fisiológico e afetar o comprometimento da capacidade dos camarões de resistir a doenças (MILLARD et al., 2021). Nesse cenário, as regiões subtropicais acabam ficando mais expostas as oscilações térmicas especialmente durante os períodos de outono, inverno e primavera, que por sua vez, estão correlacionadas diretamente com o aparecimento de enfermidades.

Mudanças na temperatura da água tem efeito direto, sobre o crescimento e a sobrevivência de organismos aquáticos (HENING; ANDREATTA, 1998), sendo capaz de ocasionar perturbações sobre os processos fisiológicos e sobre o sistema imune (MALEV

et al., 2010). Quando exposto a baixas temperaturas, os camarões sofrem com alterações metabólicas ocasionando um desequilíbrio na homeostase fisiológica (FAN et al., 2016; HE et al., 2018; LIU et al., 2019), com redução da fluidez de membrana, perda da integridade de proteínas, mau funcionamento da respiração celular, estresse oxidativo e várias outras alterações no seu metabolismo (HAYWARD; MANSO; COSSINS, 2014), dificultando a resposta imune frente a infecção por agentes patogênicos.

Um dos mecanismos de resistência ao frio é a incorporação de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídios que compõem as membranas celulares, através de um processo conhecido como adaptação homeoviscosa, melhorando desta forma a fluidez das membranas celulares (TEETS; DENLINGER, 2013; TURCHINI; TORSTENSEN; NG, 2009). Durante os períodos de frio esse processo pode ser potencializado através da adição de LC-PUFA na dieta, configurando uma importante ferramenta contra as baixas temperaturas (CHOWANSKI et al., 2015), otimizando o transporte intermembranar e os processos de sinalização celular.

Diante desse contexto, o protista *Aurantiochytrium* sp. apresenta-se como uma rica fonte de LC-PUFA (K. V. et al., 2021), contendo alto teor lipídico, variando entre 55 e 75% na matéria seca, com concentração de DHA de até 48% do total de ácidos graxos, o que torna um produto interessante para ser utilizado como fonte de LC-PUFA n-3 (GUPTA; BARROW; PURI, 2012; MARCHAN et al., 2018). Ainda, o *Aurantiochytrium* sp. possui parede celular composta por β -1-3 glicanas, as quais têm sido relacionadas ao sistema imune de camarões (ROJO-CEBREROS et al., 2017), devido a seu efeito antioxidante e imunomodulador (LI et al., 2019), que pode aumentar a resistência a enfermidades.

A adição dietética de *Aurantiochytrium* sp. para camarões sob temperatura ótima de cultivo apresentou uma melhora na taxa de crescimento específico (WANG et al., 2017), bem como aumento do nível de DHA no músculo (GUIMARÃES et al., 2019). Os aditivos alimentares podem ter efeitos potencialmente benéficos como antioxidantes dietéticos (AIRANTHI; HOSOKAWA; MIYASHITA, 2011), com reflexos sobre a resistência dos camarões à variação térmica, além de promover melhora nos parâmetros hemato-imunológicos (SCHLEDER et al., 2018).

A suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. para tilápias cultivadas sob temperatura subótima (22°C) já demonstrou uma melhora na eficiência alimentar, com

maiores concentrações de DHA no músculo (NOBREGA et al., 2019), indicando os benefícios de sua suplementação sob temperatura subótima. Assim, acredita-se que a suplementação de *Aurantiochytrium* sp. em dieta para camarões cultivados em temperatura subótima e infectados com WSSV em associação a flutuação térmica possa promover uma melhora na sobrevivência e nos parâmetros hemato-imunológicos. Dessa forma, o desenvolvimento de um aditivo que possa conferir resistência ao WSSV em baixas temperaturas, pode alavancar o desenvolvimento da aquicultura a nível internacional nas regiões subtropicais.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Material biológico

Os camarões utilizados foram da espécie *Penaeus vannamei*, adquiridos na empresa Aquatec Aquicultura Ltda, localizada em Canguaretama no Rio Grande do Norte. A linhagem utilizada foi Speedline de crescimento de alta sanidade. A larvicultura foi realizada no laboratório Itapoá Aquicultura Ltda, e as pós-larvas foram então transferidas para o Laboratório de Camarões Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LCM/UFSC), Florianópolis-SC, onde foram cultivadas até atingirem o peso inicial (3g) para serem transferidas para os tanques experimentais.

3.2.2. Formulação das dietas e manejo alimentar

As dietas foram realizadas conforme as exigências nutricionais para o *P. vannamei* (NRC, 2011), com 35% de proteína bruta. Foram realizadas cinco dietas, a controle (T0) e quatro com diferentes porcentagens de inclusão de *Aurantiochytrium* sp.: 1% (T1), 2% (T2), 3% (T3) e 4% (T4), representadas na tabela 1. O *Aurantiochytrium* sp. foi obtido da empresa Sparos® e a relação dos ácidos graxos foi ajustado entre as dietas conforme a tabela 2.

Para ambas as dietas, os ingredientes da ração foram primeiramente moídos e peneirados em malha de 600 µm, depois misturados a seco os macro e micro ingredientes. Depois que cada mistura estava pronta, os óleos de soja e lecitina foram adicionados. Finalmente, a umidade foi ajustada para 15%. A dieta foi peletizada em uma matriz de 1,5 mm e seca em estufa a 40°C por aproximadamente 12 h. Em seguida,

a ração foi mantida refrigerada até o momento de cada alimentação, para evitar a oxidação e perda de ácidos graxos das dietas. A taxa de alimentação seguiu a tabela de Van Wyk e Scarpa (1999), os animais foram alimentados quatro vezes ao dia (08:00, 11:00, 14:00, 17:00), durante a fase de crescimento e engorda de acordo com as biometrias semanais.

Tabela 1 - Dietas experimentais utilizadas na engorda e no desafio da infecção viral do *P. vannamei* em sistema de água clara em temperatura subótima.

Ingredientes	Inclusão				
	Controle	1%	2%	3%	4%
Farelo de Soja	30	29	29	29	29
Farinha de Trigo	15,94	16,64	16,49	16,49	16,49
Farinha de Vísceras de Frango	14	14	14	14	14
Farinha de Peixe	16	16	16	16	16
Farinha de Soja	2,2	1,5	1,5	1,35	1,1
Fosfato Monocálcico	1	1	1	1	1
Sulfato de Magnésio	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cloreto de Sódio P.A.	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Cloreto de Potássio	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
DL-Metionina	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Premix Vitamínico	1	1	1	1	1
Premix Mineral	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Vit. C- ácidoascórbico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Óleo de Peixe	2	2,5	2,75	3	3
Óleo de Soja	1	0,5	0,25	0	0
Caboximetilcelulose	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Caulim	10	10	9,15	8,3	7,55
<i>Aurantiochytrium sp.</i>	0	1	2	3	4
Cloridrato de Colina	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Total	100	100	100	100	100

Tabela 2 - Composição de ácidos graxos nas dietas experimentais (%)

Ácidos Graxos	Composição (%)				
	Controle	1%	2%	3%	4%
n-3	0,91	1	1,11	1,23	1,32
n-6	2,47	1,96	1,89	1,74	1,65
n-3/n-6	0,37	0,51	0,59	0,7	0,8
EPA	0,09	0,11	0,12	0,12	0,12
DHA	0,24	0,38	0,5	0,62	0,73
DHA/EPA	2,6	3,52	4,34	5,04	5,86

3.2.3 Delineamento experimental

A primeira etapa do experimento ocorreu no LCM/UFSC, onde os camarões com peso inicial de 3 g foram alojados em 15 tanques com volume útil de 400 L (100 camarões/m³). O cultivo experimental foi sob delineamento inteiramente ao acaso com cinco tratamentos e 3 repetições, sendo os tratamentos compostos da seguinte forma: uma dieta controle (T0) e quatro com diferentes porcentagens de inclusão do microrganismo *Aurantiochytrium* sp.: 1% (T1); 2% (T2); 3% (T3) e 4% (T4). Os animais permaneceram por 63 dias a temperatura de 22°C, onde foram mantidos em ambiente controlado através do auxílio de climatizador de ar, trocador de calor (Fromtherm 160FT®) e aquecedores de titânio (800 W). A taxa de renovação diária foi de 80% e a oxigenação em todas as unidades ocorreu via sistema de soprador de ar acoplado a mangueiras microperfuradas.

Na segunda etapa, os camarões foram transferidos para o Laboratório de Aquicultura (LAq/IFC), Araquari-SC, onde foram alocados em tanques com volume útil de 50 L (14 animais/tanque). Após a aclimação, os camarões passaram por 48 horas de adaptação e no terceiro dia foi realizada a infecção oralmente, via gavagem, com inóculo do vírus da síndrome da mancha branca, com carga viral total de $2,6 \times 10^6$ por grama de animal. Para determinar a dose inoculada foi realizado previamente dois testes pilotos para estimar o valor de DL 50 (dose letal). Os tratamentos dietéticos foram mantidos, apenas como controle negativo (CN) da infecção viral foi acrescentado mais um grupo, no qual os camarões foram inoculados com inóculo livre do WSSV, e submetidos apenas ao estresse térmico.

O desafio do estresse térmico foi realizado de forma concomitante ao desafio da infecção viral. Após 4,5 dias (108 h) da inoculação viral sob temperatura subótima de 22°C, a temperatura da água dos tanques foi elevada para 28 °C durante 12 h, incrementando $0,5 \text{ } ^\circ\text{C h}^{-1}$. Os animais foram mantidos sob temperatura de 28°C por mais dois dias (48 h), totalizando sete dias (168 h) de ensaio de infecção viral associada ao estresse térmico. Após a infecção viral o consumo de ração reduziu significativamente, ocorrendo *ad libidum*, disposto através de bandejas. O monitoramento da mortalidade foi realizado a cada 3 horas durante os 7 dias do ensaio.

A taxa de renovação de água diária foi de 50% e os seguintes parâmetros foram monitorados: temperatura da água ($21,78 \pm 0,67^\circ\text{C}$ e $28,43 \pm 0,65^\circ\text{C}$) aferida a cada 3 horas; oxigênio dissolvido ($7,0 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$) aferido duas vezes ao dia, usando um oxímetro (Ecosense® D0200A); PH ($8,0 \pm 0,2$) aferido uma vez ao dia, utilizando o pHmetro (AK59 AKSO®); salinidade (30 ± 2 ppm) aferido uma vez ao dia, usando o refratômetro portátil; amônia ($< 1 \text{ mg L}^{-1}$), aferido a cada 48 horas, segundo Alpha (2005).

3.2.4 Coleta de material e análises laboratoriais

A primeira coleta de hemolinfa ocorreu ainda no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC), no momento que antecedia a transferência dos camarões para o laboratório de Aquicultura (LAq/IFC), para não induzir alterações nos parâmetros hemato-imunológicos provocados pelo estresse do transporte. A segunda e a terceira coleta ocorreram no LAq/IFC, sendo a segunda coleta realizada no 4º dia após a inoculação do WSSV, no final da fase sob temperatura subótima (22°C) e a terceira coleta no 7º dia após a inoculação do WSSV, no final da fase sob temperatura ótima de 28°C .

A coleta foi composta por amostras de 12 animais por tratamento, sendo coletadas com seringas estéreis de 1 mL com uma agulha 26G resfriadas a 4°C , a coleta foi realizada na região ventral do primeiro segmento abdominal dos camarões. Trinta microlitros de hemolinfa de cada amostra foram fixados em solução de 4% de formaldeído em solução de Anticoagulante Modificado Alsever (MAS do inglês Modified Alsevier Solution) (27 mM citrato de sódio; 9 mM EDTA; 115 mM glicose; 336mM NaCl; 7,0 pH) para a contagem total de hemócitos (CTH). O restante da hemolinfa foi deixado para coagular em gelo por 2 h, depois foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 10 min a 4°C em centrífuga refrigerada para obtenção do soro, que foi então armazenado a -20°C para uso posterior em outras análises imunológicas. O número de hemócitos por mL de hemolinfa foi estimado por contagem direta em câmara de Neubauer, em solução com diluição conhecida.

Para determinar o título de aglutinação do soro, 50 μL de soro de camarão foram diluídas em série em TBS-1 (50 mM Tris, 150 mMNaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7,4) em uma

placa de 96 micropoços com fundo côncavo. Cada poço recebeu 50 µL de solução de eritrócitos de cão a 2% em TBS-Lecitina, as placas foram incubadas por 2h em temperatura ambiente em uma câmara umidificada. O controle foi preparado através da substituição do soro por TBS-lecitina. O título de aglutinação sérica foi definido como o valor recíproco obtido a partir da maior diluição capaz de aglutinar eritrócitos, segundo Maggioni et al. (2004). Todas as amostras foram realizadas em triplicata.

A atividade da fenoloxidase (PO) foi determinada por espectrofotometria (DO 490 nm) através da formação de pigmento dopacromo após a oxidação do substrato L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA, Sigma Chemical Co., EUA), utilizando a metodologia descrita por Soderhall e Hall (1984). As amostras de soro foram diluídas (1:15) em TBS-PO (10mM Tris, 336 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, pH 7,6) e 50 µL desta solução foram pré-incubados com um igual volume da enzima tripsina (Sigma, 1 mg mL⁻¹) por 5 min a 20°C em placas de 96 micropoços (fundo plano). Após incubação, 50 µL de L-DOPA (Sigma, 3 mg mL⁻¹) foram adicionados em cada poço, e a formação do dopacromo foi monitorada após 5 e 10 min. No controle da reação, o soro foi substituído por TBS-PO. A atividade da PO específica foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância min⁻¹ mg⁻¹ de proteína e a atividade da PO absoluta foi expressa em unidades de atividade da enzima (U) através da variação de 0,001 na absorbância min⁻¹ ml⁻¹.

A concentração de proteína na hemolinfa foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando soro-albumina bovina como padrão.

3.2.5 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado de forma que todos os tratamentos estivessem expostos as mesmas variações. Para verificação da mortalidade foi utilizado o teste de Kaplan-Meier utilizando o software STATISTICA 13. Todos os dados foram testados quanto a normalidade e homogeneidade para atender os requisitos da ANOVA e MANOVA. Para avaliar o efeito dos diferentes níveis de suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. e da infecção WSSV associado ao estresse térmico sobre os parâmetros hemato-imunológicos foi realizado o teste de ANOVA Fatorial (Fator 1: dieta; Fator 2: infecção associada ao estresse térmico) seguido

de Tukey. Para comparar os parâmetros hemato-imunológicos dos diferentes níveis de suplementação dietética de *Aurantiochytrium* sp. após infecção em relação ao grupo não infectado (controle negativo) foi utilizado ANOVA *One-way* seguido do teste de Dunnet. Por fim, foi realizado análises de dissimilaridade e agrupamento com base na análise de variância e covariância multivariada (MANOVA) para relacionar os diferentes parâmetros e condições avaliadas, utilizando o pacote Multivariada em ambiente R. O nível de significância adotado foi de 5% em todas as análises estatísticas.

3.3 Resultados

Durante o experimento, todos os parâmetros de qualidade de água apresentaram-se dentro dos padrões apropriados para espécie e fase de cultivo de acordo com Van Wyk e Scarpa (1999), sem diferença significativa entre os tratamentos. A tabela 3 apresenta a mortalidade acumulada durante a fase de temperatura subótima (22°C), fase de incremento térmico, fase de temperatura de 28 °C e a mortalidade acumulada total do desafio com o WSSV associado com estresse térmico nos diferentes tratamentos.

Tabela 3 - Mortalidade cumulativa final (%) de camarões *P. vannamei* alimentados com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de *Aurantiochytrium* sp. após a infecção com WSSV associada ao estresse térmico.

Tratamento	Fase sob temperatura 22 °C	Fase de incremento térmico	Fase sob temperatura 28 °C	Mortalidade acumulada total
T0	40,8 ^B ± 0,21	0,0 ^A	20,8 ^A ± 0,16	61,7 ^B ± 0,12
T1	26,7 ^B ± 0,23	0,0 ^A	20,0 ^A ± 0,17	46,7 ^B ± 0,40
T2	21,9 ^B ± 0,11	3,7 ^A ± 0,06	28,5 ^A ± 0,05	54,1 ^B ± 0,13
T3	10,7 ^A ± 0,01	0,0 ^A	46,3 ^A ± 0,03	57,0 ^B ± 0,02
T4	16,7 ^A ± 0,15	3,3 ^A ± 0,05	16,7 ^A ± 0,20	36,7 ^A ± 0,35
duração (h)	108,0	12,0	48,0	168,0

*Letras iguais na coluna indicam ausência de diferença significativa no teste de Kaplan-Meier, comparando as dietas experimentais em relação ao T0 (tratamento controle).

*Ao comparar as dietas experimentais em relação ao CN (tratamento não infectado), apenas o T3 na fase de temperatura sob 22°C se assemelhou ao CN durante todo ensaio.

Ao final do desafio, os animais do T4 foram os que apresentaram as menores mortalidades em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$), com 36,7% de mortalidade, demonstrando a eficiência da incorporação da microalga na dieta. O tratamento não suplementado foi o que apresentou pior resistência ao desafio viral associado ao estresse térmico, apresentando a maior mortalidade total (61,7 %) e durante a fase sob temperatura de 22 °C (40,8 %), e a terceira maior mortalidade durante a fase sob temperatura de 28 °C (20,8 %). A variação térmica de forma isolada não foi capaz de ocasionar nenhuma mortalidade, como foi observado no CN, já que este tratamento não foi inoculado com o WSSV.

Na fase de temperatura de 22°C, todos os tratamentos com inclusão da microalga apresentaram menor mortalidade absoluta, no entanto, apenas o T3 e o T4 foram significativamente menores em relação ao T0 ($p < 0,05$). Em contrapartida, o T3 foi o que apresentou maior mortalidade após a elevação da temperatura, de modo que ao final do desafio apenas o T4 apresentou menor mortalidade em relação ao T0 ($p < 0,05$).

A tabela 4 apresenta os resultados dos parâmetros hemato-imunológicos nos três diferentes períodos do experimento. Antes da infecção não houve diferenças nos parâmetros hemato-imunológicos entre os tratamentos, com exceção da CTH, que foi maior no T1. Após o desafio, foi possível observar algumas tendências nos parâmetros, com alterações ocasionadas após a infecção do WSSV e após o estresse térmico. A contagem de hemócitos reduziu expressivamente após a infecção do WSSV em todos os tratamentos no período sob 22 °C, e ainda mais após o estresse térmico ($p < 0,05$). O estresse térmico sozinho também ocasionou uma redução significativa da CTH no grupo CN.

Tabela 4 - Parâmetros hemato-imunológicos de camarões *L. vannamei* alimentado com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de *Aurantiochytrium sp.* nos três períodos: antes da infecção viral (22°C), 4,5 dias após a infecção com WSSV (22°C) e 7 dias após a infecção viral (28°C).

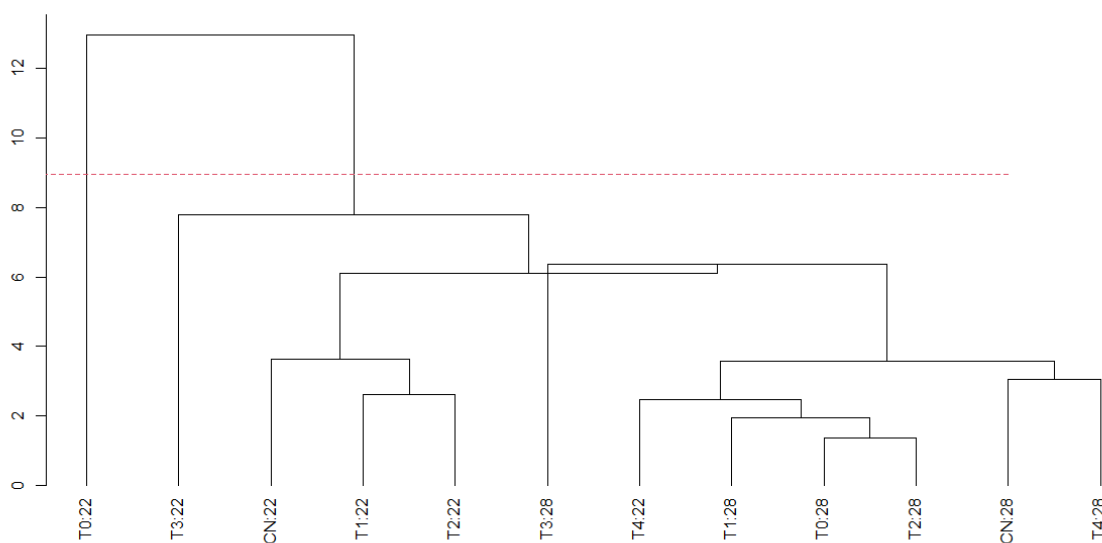
	Tratamento	CTH (10 ⁶)	Proteína (mg/mL)	PO absoluta (U/min/ml)	PO específica (U/min/mg de proteína)	Título (log ²)
1ª coleta antes da infecção WSSV (22°C)	T0	53,90±5,77	16,78±4,38	8967,11±3738,16	609,01±436,28	9,33±0,58
	T1	100,78±19,44	16,34±4,88	13447,11±3256,41	877,01±378,29	10,33±0,58
	T2	53,53±20,43	16,16±1,00	9592,88±3479±12	594,14±215,68	9,00±1,00
	T3	55,76±12,47	16,46±3,77	8305,77±4542,41	496,06±329,16	9,91±0,87
	T4	57,13±30,52	19,94±6,31	8711,11±2451,13	469,88±198,51	9,77±0,88
2ª coleta 4,5 dias após infecção WSSV (22°C)	CN	27,58±13,14	14,35±0,93	4354,67±1839,94	300,48±112,16	8,74±1,08
	T0	23,21±7,12	13,53±1,77	5721,33±3943,09	388,79±210,30	10,02±0,58
	T1	25,89±12,90	13,91±1,38	3626,67±2100,83	254,15±130,99	8,02±0,73
	T2	21±8,77	13,11±1,25	3170,67±528,96	198,10±18,42	8,45±0,56
	T3	27,73±15,22	10,95±2,49	4500,00±739,01	433,23±164,81	8,42±0,38
T4	16,83±4,90	9,94±1,15	3168,00±597,14	322,53±29,48	8,06±0,93	
3ª coleta 7 dias após infecção WSSV (28°C)	CN	14,71±5,68	11,51±0,59	1738,67±426,63	153,91±44,73	8,63±0,40
	T0	3,76±3,54	11,71±1,45	1658,67±677,27	148,3±79,59	8,4±0,65
	T1	6,03±6,88	11,42±4,39	1897,33±890,32	184,01±116,28	7,37±0,48
	T2	8,28±4,40	11,59±0,58	2486,67±1120,25	212,74±92,88	8,09±0,36
	T3	4,70±7,08	13,41±2,43	2764,00±1330,16	223,63±112,60	8±1,00
T4	9,07±7,11	11,84±2,38	1556,00±289,00	133,34±34,78	9,24±0,54	
Fator 1: Dieta		0,03	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05
Fator 2: Infecção/estresse térmico		< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Interação: fator 1 e 2		0,02	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05

De forma geral, os valores médios no teste de aglutinação apresentaram uma redução ao longo do desafio, diferindo entre os momentos antes e após a infecção ($p < 0,05$), apesar do T4 apresentar a maior média ao final do bioensaio, não houve diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos. A concentração proteica, PO absoluta e PO relativa apresentaram também uma redução significativa após a infecção do WSSV, sem diferença entre os tratamentos ($p > 0,05$), diferindo apenas entre os momentos antes e após a infecção ($p < 0,05$).

Em relação ao grupo CN, embora o estresse térmico não tenha sido capaz de ocasionar nenhuma mortalidade, ocasionou perturbações significativas nos parâmetros hemato-imunológicos dos camarões. Ao realizar a análise de variância multifatorial MANOVA, no qual incluiu-se todos os dados do experimento, observa-se que o T0

durante o período sob temperatura de 22°C diferiu dos demais tratamentos, em decorrência do expressivo aumento da mortalidade neste período, bem como dos flexos sobre a atividade da PO e do título de aglutinação (Figura 3).

Figura 3 - Gráfico da análise de agrupamento centroide com base na análise de variância e covariância multivariada, considerando os dados de mortalidade e parâmetros hemato-imunológicos de *P. vannamei* alimentado com os níveis 0 (T0), 1 (T1), 2 (T2), 3 (T3) e 4% (T4) de *Aurantiochytrium sp.* após a infecção com WSSV nas temperaturas 22 °C e 28 °C, incluindo o grupo controle negativo da infecção viral (CN).



*Linha vermelha tracejada indica o ponto de corte pelo método Mojena.

3.4. Discussão

Ao final do desafio, todos os níveis de suplementação (1, 2, 3 e 4%) apresentaram mortalidade inferior, em termos absolutos, em relação ao grupo controle (0%). No entanto, estas diferenças na mortalidade foram mais expressivas durante o período sob temperatura subótima (22 °C), sendo inclusive significativamente menores nos tratamentos com maiores níveis suplementação (3 e 4%). Tal achado, pode estar associado ao fato de a *Aurantiochytrium sp.* possuir β -1,3-glicanos na constituição de sua parede celular (ROJO-CEBREROS et al., 2017). Esse polissacarídeo apresenta propriedades promotoras da saúde animal, tais como ação antioxidante, anti-inflamatória e imunomoestimulante (WU et al., 2016., PRZYLSKA-DIAS et al., 2013; LI et al., 2019). Em camarões marinhos, diferentes estudos demonstraram que a

suplementação dietética de β -1,3-glicanos promoveu uma maior resistência destes animais frente à infecção pelo WSSV (OCHOA-ÁLVAREZ et al., 2021; BAI et al., 2014). Estes resultados estão de acordo com o observado no presente estudo.

Em paralelo, a *Aurantiochytrium* sp. é capaz de produzir ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) tais como o ácido eicosapentaenóico (EPA), o ácido docosahexaenóico (DHA) e entre outros (YANG et al., 2022), sendo especialmente rica em DHA (MARCHAN et al., 2018). Além disso, ela é capaz de sintetizar outros compostos bioativos, como os carotenoides, em particular, o esqualeno (WATANABE et al., 2018). Estes compostos podem ser essencialmente úteis para incrementar a resistência ao frio em animais aquáticos ectodérmicos, bem como minimizar os seus efeitos deletérios, uma vez que a redução da temperatura pode ocasionar a perda da fluidez da membrana, mal funcionamento das proteínas transmembranas, degradação e agregação das proteínas, danos oxidativos e entre outros (HAYWARD; MANSO; COSSINS, 2014; CHOWANSKI et al., 2015; TEETS; DENLINGER, 2013).

A variação na composição de ácidos graxos dos fosfolípidios é particularmente importante durante o processo de adaptação às mudanças de temperatura. Geralmente, há um aumento na proporção de PUFA e ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e uma redução de ácidos graxos saturados (SFA) nos fosfolípidios de membrana (LIU et al., 2018; TOCHER, 2003). O aumento de PUFA mantém o estado cristal-líquido da matriz lipídica, o que permite que a membrana continue funcionando adequadamente, para compensar a solidificação induzida pelo frio das bicamadas lipídicas (ABDEL-GHANY et al., 2019; KOSTETSKY; VELANSKY; SANINA et al., 2013).

Neste sentido, esta rica constituição de compostos bioativos da *Aurantiochytrium* sp. pode estar associada aos efeitos benéficos observados no presente estudo, em particular ao incremento da resistência dos camarões frente à infecção viral sob baixa temperatura, mais especificamente os níveis de suplementação de 3 e 4%. No entanto, quando os camarões foram submetidos ao estresse térmico por elevação da temperatura, os animais suplementados com 3% de *Aurantiochytrium* sp. apresentaram elevada mortalidade, se equiparando aos valores do tratamento controle (T0). Esta baixa tolerância à oscilação térmica dos animais do T3 não foi totalmente compreendida, necessitando de investigações complementares.

Os parâmetros hemato-imunológicos apresentaram uma expressiva redução ao longo do ensaio, demonstrando o efeito imunossupressor ocasionado pela infecção viral. Este efeito já foi evidenciado em diversos trabalhos com infecção com WSSV (ABBASZADEH et al., 2019; IMMANUEL et al., 2012; JI; YAO; WANG, 2011; LEHMANN et al., 2016; MAI; WANG, 2010). A redução nos parâmetros imunes também foi observada no grupo CN (não infectados), reforçando que o estresse térmico pode ter efeitos deletérios com perturbações no sistema imune, tal como relatado por Qiu et al. (2011) e Zhou et al. (2017). Estes resultados reafirmam a importância da criação de novas tecnologias para minimizar os impactos do estresse térmico em particular nas fazendas de criação localizadas em regiões subtropicais.

A análise multivariada realizada com os dados de mortalidade e dos parâmetros hemato-imunológicos, revelou que os efeitos deletérios da infecção viral associada ao estresse térmico foram mais proeminentes no grupo controle (T0) sob baixa temperatura (22 °C), em especial devido à expressiva mortalidade no período e os reflexos sobre a atividade da PO e do título de aglutinação. Esta constatação reforça que a *Aurantiochytrium* sp., em particular o seu conteúdo rico de compostos bioativos, pode causar efeitos positivos sobre a saúde de camarões marinhos, bem como à resistência dos mesmos ao estresse por frio, conforme discutido acima.

Antes do desafio viral, os animais criados sob temperatura subótima e alimentados com 1% de suplementação (T1) apresentaram uma superioridade, em termos gerais, nos parâmetros imunes. Porém, isto não se refletiu na mortalidade e na resposta imune dos animais após a infecção viral, os quais demonstraram apenas a segunda menor mortalidade no final do desafio. Em um estudo realizado por Yang et al. (2022), sob temperatura ótima, também foi observado efeitos benéficos da suplementação dietética de 1% do extrato de *Aurantiochytrium* sp. sobre aspectos fisiológicos do peixe zebra (*Danio rerio*). Os autores relataram o aumento da performance zootécnica, melhora da síntese de lipídios e menor dano oxidativo ocasionado pela peroxidação lipídica. Deste modo, embora níveis mais baixos de suplementação de *Aurantiochytrium* sp. possam refletir em respostas fisiológicas positivas, novos estudos ainda precisam ser realizados no intuito de melhor compreender o possível efeito imunomodulador destes níveis sobre animais aquáticos sob diferentes temperaturas e condições de saúde.

3.5. Conclusão

A suplementação de 4% de *Aurantiochytrium* sp. resultou em menor mortalidade dos camarões ao longo do desafio viral associado ao estresse térmico. Em temperatura baixa (22°C), a suplementação com *Aurantiochytrium* sp., em particular os níveis 3% e 4%, aumentou a resistência dos animais à infecção viral, demonstrando um grande potencial para uso em períodos de temperaturas amenas em regiões subtropicais. O perfil de variação dos parâmetros hemato-imunológicos avaliados reforça que a suplementação pode mitigar os impactos das baixas temperaturas, sob infecção ou não, a depender do nível de suplementação, demonstrando os efeitos imunossupressor ocasionado pelo estresse térmico.

4. REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, Akbar et al. Effects of different carbon sources and dietary protein levels in a biofloc system on growth performance, immune response against white spot syndrome virus infection and cathepsin L gene expression of *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 4, p. 1162-1176, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13991>
- ABCC. Censo da carcinicultura dos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí 2021. **ABCC**, 2022a. Disponível em: https://abccam.com.br/wpcontent/uploads/2023/02/Completo_Censo-2022_23_D.pdf
- ABCC. Desafios e oportunidades para a carcinicultura Brasileira em 2023. **Feed & Food**, 2022b. Disponível em: <https://abccam.com.br/wp-content/uploads/2022/10/Coluna-ABCC-News-outubro-22.pdf>
- ABDEL-GHANY, Heba M. et al. Dietary lipid sources affect cold tolerance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Jornal of Thermal Biology**, v. 79, p. 50-55. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.11.009>
- ABDEL-RAHIM, Mohamed et al. Dietary supplementation of brown seaweed and/or nucleotides improved shrimp performance, health status and cold-tolerant gene expression of juvenile whiteleg shrimp during the winter season. **Marine drugs**, v. 19, n. 175, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md19030175>
- ABDELRAHMAN, Hisham A.; ABEBE, Asheber; BOYD, Claude E. Influence of variation in water temperature on survival, growth and yield of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* in inland ponds for low-salinity culture. **Aquaculture Research**, v. 50, n. 2, p. 658-672, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13943>
- AIRANTHI, M. K. Widjaja-Adhi; HOSOKAWA, Masashi; MIYASHITA, Kazuo. Comparative antioxidant activity of edible Japanese brown seaweeds. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 1, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01915.x>
- BAI, Nan et al. Effects of β -glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. **Aquaculture**, v. 426-427, p. 66-73, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.01.019>
- BRADFORD, Marion M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAY, W. A.; LAWRENCE, A. L.; LEUNG-TRUJILLO, J. R. The effect of salinity on growth and survival of *Penaeus vannamei*, with observations on the interaction of IHNV virus and salinity. **Aquaculture**, v. 122, p. 133-146, 1994. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90505-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90505-3)
- CAVALLI, L. S. et al. White spot syndrome virus in wild penaeid shrimp caught in coastal and offshore waters in the southern Atlantic Ocean. **Journal of Fish Diseases**, v. 33, n. 6, p. 533-536, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01141.x>
- CHAUTON, Matilde S. et al. A techno-economic analysis of industrial production of marine microalgae as a source of EPA and DHA-rich raw material for aquafeed: Research challenges and possibilities. **Aquaculture**, v. 436, p. 95-103, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.10.038>

- CHOWANSKI, Szymon et al. Cold induced changes in lipid, protein and carbohydrate levels in the tropical insect *Gromphadorhina coquereliana*. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A**, v. 183, p. 57-63, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.01.007>
- CORRÊA, Camila Fernades et al. Mixes of plant oils as fish oil substitutes for Nile tilapia at optimal and cold suboptimal temperature. **Aquaculture**, v. 497, p. 82-90, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.07.034>
- COSSINS, Andrew R. Adaptive responses of fish membranes to altered environmental temperature. **Biochemical Society Transactions**, p. 332-333, 1983.
- DEY, Bipul K. et al. Causative agent, diagnosis and management of white spot disease in shrimp: A review. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, p. 822-865, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/raq.12352>
- FAN, Lanfen et al. Comparative proteomic identification of the hepatopancreas response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture**, v. 454, p. 27-34, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.016>
- FAN, Lanfen; WANG, Anli; WU, Yingxia. Comparative proteomic identification of the hemocyte response to cold stress in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 19-206, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.017>
- FAN, Lanfen; WANG, Lei; WANG, Zhenlu. Proteomic characterization of the hepatopancreas in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* under cold stress: Revealing the organism homeostasis mechanism. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, p. 438-449, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.06.037>
- FAO. The state of food security and nutrition in the world: building climate resilience for food security and nutrition. **FAO**, 2018. Disponível em: <https://www.fao.org/3/i9553en/i9553en.pdf>
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture: Sustainability in Action. **FAO**, 2020. Disponível em: <https://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.pdf>
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture: Towards Blue Transformation. **FAO**, 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/3/cc0461en/cc0461en.pdf>
- GHAEDNIA, B. et al. Effect of hot-water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicustranian*. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 10, n. 4, p. 616-630, 2011.
- GUIMARÃES, Ariane Martins et al.; *Aurantiochytrium* sp. meal can replace fish oil in practical diets for the juvenile Pacific white shrimp. **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 4, p. 798-807, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/anu.12897>
- GUPTA, Adarsha; BARROW, Colin J.; PURI, Munish. Omega-3 biotechnology: Thraustochytrids as a novel source of omega-3 oils. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1733-1745, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.014>
- HAYWARD, Scott A. L.; MANZO, Bruno; COSSINS, Andrew R. Molecular basis of chill resistance adaptations in poikilothermic animals. **Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 6-15, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.096537>
- HE, Pingping et al. Identification of microRNAs involved in cold adaptation of *Litopenaeus vannamei* by high-throughput sequencing. **Gene**, v. 677, p. 24-31, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.07.042>
- HENING, O. L.; ANDREATTA, E. R. Effect of temperature in an intensive nursery system for *Penaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967). **Aquaculture**, v. 164, p. 167-172, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00184-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00184-7)

HOSEINIFAR, Seyed Hossein; DADAR, Maryam.; RINGØ, Einar. Modulation of nutrient digestibility and digestive enzyme activities in aquatic animals: The functional feed additives scenario. **Aquaculture Research**, p. 1-14, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13368>

IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal. **IBGE**, 2020. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940#resultado>

IMMANUEL, Grasian et al. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 4, p. 551-564, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.003>

Jl, Pei-Feng; YAO, Cui-Luan; WANG, Zhi-Yong. Reactive oxygen system plays an important role in shrimp *Litopenaeus vannamei* defense against *Vibrio parahaemolyticus* and WSSV infection. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 96, n. 1, p. 9-20, 2011. Disponível em: DOI: <https://doi.org/10.3354/dao02373>

JIA, Xu-Ying et al. Energy metabolic enzyme responses of *Litopenaeus vannamei* to thermal stress: a comparative study in freshwater and seawater conditions. **Aquaculture International**, v. 26, n. 4, p. 1067-1081, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-018-0268-9>

K. V., Jaseera et al. Dietary supplementation of microalgae, *Aurantiochytrium* sp. and co-feeding with *Artemia* enhances the growth, stress tolerance and survival in *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) post larvae. **Aquaculture**, v. 533, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736176>

K. V., Jaseera et al. Isolation and phylogenetic identification of heterotrophic thraustochytrids from mangrove habitats along the southwest coast of India and prospecting their PUFA accumulation. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, p. 1057-1068, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1627-7>

KOSTETSKY, E. Ya.; VELANSKY, P. V.; SANINA, N. M. Phase transitions of phospholipids as a criterion for assessing the capacity for thermal adaptation in fish. **Russian Journal of Marine Biology**, v. 39, n. 3, p. 214-222, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1134/S1063074013030073>

KUMAR, Vikas et al. Replacement of fish oil with *Schizochytrium* meal and its impacts on the growth and lipid metabolism of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1769-1781, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/anu.12816>

LEE JR, Richard E. et al. Rapid cold-hardening increases membrane fluidity and cold tolerance of insect cells. **Cryobiology**, v. 52, n. 3, p. 459-463, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2006.03.003>

LEHMANN, Maurício et al. Hypoxia increases susceptibility of Pacific white shrimp to white spot syndrome virus (WSSV). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 2, p. 397-403, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-7942>

LI, Chaozheng; WENG, Shaoping; HE, Jianguo. WSSV–host interaction: Host response and immune evasion. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 558-571, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.10.043>

LI, Shuangfei et al. Enhanced Growth Performance Physiological and Biochemical Indexes of *Trachinotus ovatus* Fed With Marine Microalgae *Aurantiochytrium* sp. Rich in n-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Frontiers in Marine Science**, v. 7, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.609837>

LIANG, Yan et al. ATP synthesis is active on the cell surface of the shrimp *Litopenaeus vannamei* and is suppressed by WSSV infection. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 49, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0275-7>

LIU, Chengyue et al. Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition on different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo solar*). **Aquaculture**, v. 515, 734587, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734587>

LIU, Jiajia et al. Strain-specific changes in the gut microbiota profiles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to cold stress. **Aquaculture**, v. 503, p. 357-366, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.01.026>

LIU, Lei et al. Infection of WSSV shows potential promise of a novel antiviral amino-nitrophenyl medicine for application in culture of shrimp seedling. **Aquaculture**, v. 534, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736283>

MAGGIONI, Daniela S. et al. Evaluation of some hemato-immunological parameters in female shrimp *Litopenaeus vannamei* submitted to unilateral eyestalk ablation in association with a diet supplemented with superdoses of ascorbic acid as a form of immunostimulation. **Aquaculture**, v. 241, n. 1-4, p. 501-515, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00530-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00530-1)

MAI, Wei JUN; WANG, Wei-na. Protection of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) against the White Spot Syndrome Virus (WSSV) when injected with shrimp lysozyme. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 28, n. 4, p. 727-733, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.01.002>

MALEV, Olga et al. Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 152, n. 4, p. 433-443, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.07.006>

MARCHAN, Loris Fossier et al. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of thraustochytrids: A review. **Biotechnology Advances**, v.36, p. 26-26, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.09.003>

MEENAKSHI, S. et al. In vivo administration of fucoidan from *Turbinaria decurrens* protects shrimps from white spot syndrome virus. **Indian Journal of Geo Marine Sciences**, v. 48, n. 2, p. 212-219, 2019.

MELLO, G. L. Novos Horizontes na criação de camarões marinhos em Santa Catarina. **ABCC**, v. 23, n. 1, p. 56-60, 2021. Disponível em: <https://abccam.com.br/wpcontent/uploads/2021/03/Artigo-Giovanni-de-Mello-3a-Edicao-Digital-da-Revista-da-ABCC-%E2%80%93-Janeiro-2021.pdf>

MERCIER, Laurence et al. Effect of diets containing different levels of highly unsaturated fatty acids on physiological and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) exposed to handling stress. **Aquaculture Research**, v. 40, n. 16, p. 1849-1863, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02291.x>

MILLARD, Rebecca. S.; ELLIS, R. P.; BATEMAN, K. S.; et al. How do abiotic environmental conditions influence shrimp susceptibility to disease? A critical analysis focussed on White Spot Disease. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 186, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107369>

NOBREGA, Renata Oselame et al. Dietary supplementation of *Aurantiochytrium* sp. meal, a docosahexaenoic-acid source, promotes growth of Nile tilapia at a suboptimal low temperature.

Aquaculture, v. 507, p. 500-509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.04.030>

NRC. **Nutrient Requirements of Fish and Shrimp**. Washington, 2011.

OCHOA-ÁLVAREZ, Norma A. et al. Protector effect of beta-glucans from shrimp pond-related yeasts in *Penaeus vannamei* rearing under white spot syndrome virus presence. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 49, n. 1, p. 18-28, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3856/vol49-issue1-fulltext-2514>

PENG, Jin-Xia et al. Proteomic responses under cold stress reveal unique cold tolerance mechanisms in the pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Frontiers in Physiology**, v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01399>

PRABHAKARAN, P. et al. Whole genome analysis and elucidation of docsaheaxaenoic acid (DHA) biosynthetic pathway in *Aurantiochytrium* sp. SW1. **Gene**, v.846, p.146850, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146850>

PRZYBYLSKA-DIAZ, D. A. et al. β -glucan enriched bath directly stimulates the wound healing process in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 3, p. 998-1006, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2013.05.014>

QIU, Jun et al. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 154, n. 1, p. 36-41, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.02.007>

RAHARDJO, Sinung et al. Supplementation of hairy eggplant (*Solanum ferox*) and bitter ginger (*Zingiber zerumbet*) extracts as phytobiotic agents on whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Journal of Advanced Veterinary and Animal Research**, v. 9, n. 1, p. 78-86, 2022. Disponível em: <http://doi.org/10.5455/javar.2022.i571>

ROJO-CEBREROS, Angel H. et al. Potencial of Nannochloropsis in Beta Glucan Production. **Nannochloropsis : biology, biotechnological potential and challenges**. p.181-225, 2017.

SÁNCHEZ-PAZ, Arturo. White spot syndrome virus: An overview on an emergent concern. **Veterinary Research**, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres/2010015>

SAOUD, Imad P.; DAVIS, D. Allen; ROUSE, David B. Suitability studies of inland well waters for *Litopenaeus vannamei* culture. **Aquaculture**, v.217, p. 373-383, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(02\)00418-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00418-0)

SCHLEDER, Delano Dias et al. Effect of brown seaweeds on Pacific white shrimp growth performance, gut morphology, digestive enzymes activity and resistance to white spot virus. **Aquaculture**, v. 495, p. 359-365, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.020>

SODERHALL, Kenneth; HALL, Lena. Lipopolysaccharide-Induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish haemocyte lysate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 797, p. 99-104, 1984. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(84\)90387-8](https://doi.org/10.1016/0304-4165(84)90387-8)

SHAH, Mahfuzur Rahman et al. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p.197-213, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-017-1234-z>

TEETS, Nicholas M.; DENLINGER, David L. Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold-hardening in insects. **Physiological Entomology**, v. 38, n. 2, p. 105-116, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/phen.12019>

TOCHER Douglas R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleosts fish. **Reviews in Fisheries Science**, v.11, n.2, p.107-184, 2003.

TURCHINI, Giovanni M.; TORSTENSEN, Bente E.; NG, Wing-Keong. Fish oil replacement in finfish nutrition. **Reviews in Aquaculture**, v.1, p. 10-57, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2008.01001.x>

VAN WYK, P.; SCARPA, J. Water Quality and Management. In: P. Van Wyk; M. Davis-Hodgkins; R. Laramore; et al. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, p.141-162, 1999.

WANG, Yuyu et al. Evaluation of Schizochytrium meal in microdiets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 5, p. 2328-2336, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.13068>

WATANABE, Kenshi et al. Isolation of high carotenoid-producing *Aurantiochytrium* sp. Mutants and improvement of astaxanthin productivity using metabolic information. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 5, p. 571-578, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.5650/jos.ess17230>

WEBER, Thomas E.; BOSWORTH, Brian G. Effects of 28 day exposure to cold temperature or feed restriction on growth, body composition, and expression of genes related to muscle growth and metabolism in channel catfish. **Aquaculture**, v. 246, n. 1-4, p. 483-492, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.032>

WU, Yu-Sheng et al. Beta 1,3/1,6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 57, p. 269-277, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2016.08.046>

YANG, Hao et al. Effects of Dietary Supplementation with *Aurantiochytrium* sp. on Zebrafish Growth as Determined by Transcriptomics. **Animals**, v. 12, n. 20, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani12202794>

ZEIN-ELDIN, Z. P.; GRIFFITH, G. W. The Effect of Temperature upon the Growth of Laboratory-Held Postlarval *Penaeus aztecus*. **Biological Bulletin**, v. 131, n.1, p. 186-196, 1966.

ZHOU, Meng et al. Effects of dietary taurine, carnitine and cholesterol supplementation on growth performance and immunological status of *Litopenaeus vannamei* under cold exposure. **Aquaculture Research**, v. 48, n. 3, p. 1279-1290, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/are.12970>