



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E**  
**AQUICULTURA**

**Efeito imunoestimulante da suplementação com nucleotídeos no camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.**

**Katharine Batista Santos de Souza**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzianny Maria Bezerra Cabral da  
Silva**

Orientadora

**Prof. Dr. Luis Otavio Brito da Silva**

Coorientador

**Recife,  
Fevereiro/2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

S729e

Souza, Katharine

Efeito imunoestimulante da suplementação com nucleotídeos no camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus* / Katharine Souza. - 2024.  
42 f. : il.

Orientador: Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva.

Coorientador: Luis Otavio Brito da Silva.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, Recife, 2024.

1. Camarão branco do Pacífico . 2. Imunoestimulante. 3. Nucleotídeos. 4. Vibriose. 5. Resposta imune. I. Silva, Suzianny Maria Bezerra Cabral da , orient. II. Silva, Luis Otavio Brito da, coorient. III. Título

CDD 639.3

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E**  
**AQUICULTURA**

**Efeito imunestimulante da suplementação com nucleotídeos no camarão marinho *Penaeus. vannamei* mediante desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.**

**Katharine Batista Santos de Souza**

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 28/02/2024 pela seguinte Banca Examinadora.

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva**

Orientadora

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

**Prof. Dr.<sup>a</sup> Alitiene Moura Lemos Pereira**

Membro Externo

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA, Brasil.

---

**Prof. Dr. Juliana Ferreira dos Santos**

Membro Interno

Departamento de Pesca e Aquicultura/Universidade Federal Rural de Pernambuco

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à Deus, pois foi pela sua Graça que cheguei até aqui.

## **Agradecimentos**

A Deus, por ser minha rocha durante toda a minha vida.

À minha família, por me incentivar a nunca desistir e me dar apoio em todos os momentos.

Ao meu marido, Vitor Batista, por ter me apoiado, me incentivado durante todo o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante a pós-graduação.

À Professora Dra. Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva, por ter acreditado no meu potencial, pela orientação e por todo conhecimento passado.

Ao Professor Dr. Luis Otavio Brito da Silva, pela coorientação, por todo conhecimento passado e apoio necessários para a elaboração deste trabalho.

Ao Professor Dr. Fernando Leandro dos Santos, pela contribuição nas análises histológicas e ensinamentos relacionadas ao tema.

À equipe e amigos do Laboratório de Sanidade de Animais Aquáticos, pela amizade e ajuda durante o desenvolvimento deste estudo, em especial: Gabriel Michereff, Igor Félix e Maria Eduarda Mendonça, sem vocês não seria possível concluir esta pesquisa. Muito obrigada!

À Flávia Abreu, que me incentivou a dar o melhor de mim, acreditando que eu poderia ser mestre, quando eu nem sabia que seria capaz.

À Gisely Costa, por todo seu apoio e ensinamento, sempre tive você como um exemplo, obrigada!

À Alluanan Adelson, pela paciência em me ensinar todas as técnicas da preparação das lâminas histológicas, pelo apoio e pela amizade.

Aos professores, que contribuíram para a minha formação durante esse período com ensinamentos valiosos, e aos funcionários do Departamento de Pesca e Aquicultura da UFRPE.

A todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e/ou se fizeram presentes durante este período ímpar da minha vida.

## **Resumo**

A carcinicultura enfrenta diversos desafios, incluindo questões sanitárias e ambientais. A produção do camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) lidera a produção global de crustáceos, entretanto as enfermidades bacterianas, especialmente causadas por *Vibrio spp.*, representam ameaças significativas a esse crescimento. Portanto, diversas estratégias como sistemas simbióticos e de bioflocos e, aditivos como prebióticos estão sendo avaliados, com o objetivo do fortalecimento da imunidade dos camarões, reduzindo assim a necessidade do uso de antibióticos. Dentro das possibilidades de aditivo como prebióticos, os produtos provenientes de levedura, ricos em nucleotídeos, surgem com alternativa para incrementar a saúde e o desempenho zootécnico. A suplementação com nucleotídeos emerge como uma intervenção promissora, embora a determinação dos níveis ideais de inclusão permaneça não estabelecida para algumas espécies de organismos aquáticos. Desta forma, o presente estudo visa avaliar o efeito imunestimulante da suplementação com nucleotídeo na resposta imunológica, resistência a doenças, morfologia do hepatopâncreas e contagem de vibrios do camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante um desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*. Foi conduzindo um teste com um controle RC – sem adição de nucleotídeos e outros três tratamentos com a adição de 75 mg (R75) -adição 150 mg (R150) e 300 mg (R300) de nucleotídeos/kg de ração. Após 60 dias de consumo das dietas experimentais, os camarões foram desafiados por imersão com uma suspensão bacteriana de *Vibrio parahaemolyticus* ( $10^8$  UFC/ml) por 30 dias. Durante esse período, foram registradas as taxas de mortalidade, sinais clínicos, parâmetros hemato-imunológicos, histológicos e bacteriológicos. Os resultados indicaram que os tratamentos suplementados com nucleotídeos demonstraram melhores desempenhos zootécnicos após o período de alimentação. A análise histológica revelou lesões graves, como deformação dos túbulos e necrose, em todos os grupos, enquanto as contagens bacterianas de *Vibrio sp.* no hepatopâncreas apresentaram variações significativas entre os tratamentos na primeira e terceira coleta, entre os tratamentos RC e R75 e entre R75 e R300 respectivamente, sugerindo diferentes padrões de colonização bacteriana ao longo do tempo. Conclui-se que a suplementação com nucleotídeos promoveu o aumento da biomassa e redução da taxa de mortalidade nos animais suplementados com maiores níveis de inclusão, além de beneficiar a resposta imunológica aguda em todos os tratamentos, indicando a necessidade de estudos adicionais para compreender seu impacto sobre o tecido hepatopancreático.

**Palavras-chave:** Camarão branco do Pacífico, imunestimulante, nucleotídeos, vibriose, resposta imune

**Lista de tabelas**

Tabela 1. Formulação e composição das dietas, controle e experimentais contendo nucleotídeos, utilizadas para a avaliação do desempenho do <i>P. vannamei</i> criados em sistema simbiótico por 60 dias. ....	17
Tabela 4. Contagem total de hemócitos (CTH) ( $10^6$ células $\text{ml}^{-1}$ ) e contagem diferencial (CDH) (em porcentagem) dos <i>Penaeus vannamei</i> submetidos ao desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	24
Tabela 5. Percentual e valores médios do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) do hepatopâncreas de <i>Penaeus vannamei</i> submetidos ao desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	26
Tabela 6. Classificação das alterações encontradas no hepatopâncreas de <i>Penaeus vannamei</i> examinadas ao final do desafio com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . ....	27
Tabela 7. Mortalidade cumulativa (%) de <i>Penaeus vannamei</i> ao longo do desafio bacteriano com <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	28
Tabela 8. Contagem bacteriana total ( $10^6$ células/ml) e presuntiva de vibrionáceas por tratamento (percentual de sacarose) em TCBS em <i>Penaeus vannamei</i> (hepatopâncreas) ao longo do desafio bacteriano. ....	30

Sumário	
Dedicatória.....	4
Agradecimentos .....	5
Resumo .....	6
Lista de tabelas.....	7
1. Introdução .....	9
2. Objetivos do trabalho .....	12
3. Artigo científico .....	13
4. Considerações finais.....	39
5. Referências.....	39

## 1. Introdução

A carcinicultura é uma área em constante desenvolvimento, com consequências econômicas e ambientais de alto impacto. Trata-se de um setor que tem sofrido mudanças significativas nas últimas décadas, devido a diversos fatores, entre eles a crescente demanda global por camarões, surgimento de enfermidades e diversos avanços tecnológicos (FAO, 2022).

Os camarões são uma fonte de proteína animal amplamente consumida no mercado internacional. Esse aumento da demanda de consumo faz com que produtores expandam suas operações, buscando novas tecnologias que possam maximizar a produção. As principais espécies de crustáceos cultivadas são o camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) e o camarão tigre gigante (*Penaeus monodon*) (FAO, 2022; TACON, 2020).

O *Penaeus vannamei* devido ao seu rápido crescimento e adaptabilidade a diferentes condições de cultivo é o crustáceo mais cultivado. No último quinquênio, apresentou um crescimento significativo em relação aos demais crustáceos cultivados, representando um papel importante no incremento da produção mundial desse grupo. De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura - FAO (2022), o *P. vannamei* corresponde a 51,7% da produção mundial de crustáceos, com 5,8 milhões de toneladas em 2020.

No Brasil, a produção de camarão foi de 113,3 mil toneladas em 2022, tendo um aumento de 3,4% quando comparado com 2021. Dentre as regiões brasileiras, a Região Nordeste possui um grande potencial para a produção de camarões, com 99,3% da produção nacional em 2022 (IBGE, 2022).

Entretanto apesar do crescimento significativo ao longo dos anos, um possível limitante para tal incremento é o surgimento de enfermidades, que podem prejudicar o desempenho zootécnico dos animais e proporcionar redução das áreas de cultivo e rentabilidade econômica (PEÑA-NAVARRO *et al.*, 2020). Como principais agentes infecciosos responsáveis pelas enfermidades na carcinicultura, têm-se os vírus e bactérias (MONDAL *et al.*, 2022).

Em se tratando das bactérias, as espécies do gênero *Vibrio* estão associadas a diversos animais aquáticos, como peixes, crustáceos e moluscos. Além disso, podem ser encontradas na coluna d'água e no biofilme presente em superfícies submersas, bem como em animais saudáveis, sistemas de aquicultura e tecidos animais, sendo consideradas não patogênicas e compondo parte da microbiota natural (GAO *et al.*, 2019; MOHAMAD *et al.*, 2019). Sua presença não implica necessariamente a ocorrência de uma epizootia

(ZHENG *et al.*, 2017), porém quando há um desequilíbrio entre o hospedeiro, o agente infeccioso e o ambiente, pode haver graves infecções (SATYARUP *et al.*, 2020), seja como patógeno verdadeiro ou agente oportunista, resultando em altas taxas de mortalidade, prejuízo na produção e conseqüentemente nos lucros. O estudo das vibrioses, seus efeitos e possíveis ações que possam mitigar seu surgimento são de crucial importância para os cultivos. Tendo em vista que, afetam diretamente a saúde do camarão, a qualidade dos produtos, a produção e, conseqüentemente, o sucesso do cultivo (DE SOUZA VALENTE & WAN, 2021).

Portanto, estratégias produtivas são essenciais frente aos desafios enfrentados pela carcinicultura. Sendo assim, implementar novas tecnologias que minimizem as perdas e promovam um crescimento sustentável são necessárias, como o sistema de bioflocos e simbióticos (ABIRI *et al.*, 2022; PANIGRAHI *et al.*, 2022; HE *et al.*, 2023; KHANJANI *et al.*, 2023; PANIGRAHI *et al.*, 2023). Mas além da modificação e/ou adequações dos sistemas de produção, o uso de aditivos alimentares são ferramentas interessantes para convivência com as enfermidades.

Por meio da sinergia de mecanismos de ação distintos, os aditivos desempenham um papel importante por suas propriedades bactericidas e bacteriostáticas. A inclusão de prebióticos, probióticos e simbióticos, promovem a exclusão competitiva de agentes patogênicos e desempenham um papel relevante na melhora dos parâmetros imunológicos dos camarões. Segundo o estudo de Butt *et al.* (2021), esses compostos bioativos são eficazes na melhoria da resposta adaptativa dos camarões diante da exposição a patógenos bacterianos, aprimorando sua saúde sem que haja um efeito nocivo ao consumidor final como é o caso do uso de antibióticos.

O uso dos produtos derivados de levedura tem recebido destaque na aquicultura, como aditivo em rações, contribuindo positivamente para diversos aspectos como: incremento no crescimento, imunidade e fortalecimento dos mecanismos de defesa dos camarões. Além de trazer benefícios diretos aos organismos aquáticos, a utilização dos produtos de leveduras tem sido associada à manutenção da qualidade da água, demonstrando efeito positivo na redução de resíduos e na minimização da carga orgânica nos ambientes aquáticos, favorecendo a preservação e equilíbrio ambiental (AGBOOLA *et al.*, 2021; LICONA-JAIN *et al.*, 2022; MAHDY *et al.*, 2022).

Estes produtos são notáveis por conterem uma gama diversificada de compostos imunostimulantes, tais como ácidos nucleicos, mananoligossacarídeos (MOS),  $\beta$ -glucanos e nucleotídeos. Esses componentes desempenham papel fundamental na

modulação e aprimoramento de respostas imunológicas em organismos aquáticos. Os ácidos nucleicos desencadeiam respostas imunes em camarões, agindo como agentes imunomoduladores que fortalecem a resistência contra patógenos. As leveduras constituem uma fonte natural rica em nucleotídeos e, apresentam elevada digestibilidade e capacidade de assimilação pelos organismos aquáticos (GYAN *et al.*, 2019; AGBOOLA *et al.*, 2021; ERNESTO CESANÃ *et al.*, 2021; MAHDY *et al.*, 2022; JACH *et al.*, 2022).

Os nucleotídeos são compostos bioativos de baixo peso molecular que desempenham papéis vitais na síntese de DNA e RNA, sendo essenciais para a replicação celular e a regeneração de tecidos danificados nos camarões. Atuam também na codificação e decodificação das informações genéticas, viabilizando funções metabólicas e sinalização celular. Desempenham várias funções fisiológicas e biológicas essenciais. Eles modulam a imunidade, melhoram a resistência a infecções, promovem o crescimento e desenvolvimento, mantêm a função intestinal e hepática, e estimulam a proliferação e diferenciação celular. Além disso, contribuem para proteção contra o estresse fisiológico, redução do dano ao DNA e prolongamento da vida. Os nucleotídeos são cruciais para o desenvolvimento saudável, resposta imune e adaptação ao estresse, abrindo portas para várias aplicações terapêuticas e nutricionais (DING *et al.*, 2021).

Embora os nucleotídeos sejam principalmente sintetizados nos tecidos, o sistema imunológico e as células intestinais têm uma demanda adicional e dependem parcialmente de fontes externas destes compostos (YONG *et al.*, 2020; NOVRIADI *et al.*, 2021; RAIRAT *et al.*, 2022). No contexto específico de *P. vannamei*, numerosos estudos documentam os efeitos benéficos decorrentes da inclusão de nucleotídeos nas dietas. Tais efeitos incluem melhorias no crescimento, aumento da eficiência na absorção de nutrientes provenientes das rações, desenvolvimento saudável das vilosidades intestinais e fortalecimento da resistência ao *Vibrio harveyi* e ao *Vibrio parahaemolyticus* (ABDELRAHIM *et al.*, 2021; MOK *et al.*, 2021; NOVRIADI *et al.*, 2021; RAIRAT *et al.*, 2022). Além disso, observou-se uma melhoria significativa na taxa de sobrevivência e um fortalecimento das respostas imunológicas (humorais), conforme demonstrado em diversos estudos científicos. Essas descobertas destacam a importância da suplementação de nucleotídeos na promoção da saúde e da resistência aos patógenos em camarões *P. vannamei*.

O sistema imunológico dos camarões é inato e robusto, equipado com uma ampla gama de mecanismos de defesa. Estes mecanismos incluem o sistema de cascata da profenoloxidase (sistema proPO), coagulação, fagocitose, melanização, encapsulamento e

mobilização de hemócitos. A hemolinfa, juntamente com os hemócitos, desempenham um papel fundamental na resposta imunológica, sendo diretamente vinculada aos mecanismos de defesa dos camarões (KUMAR *et al.*, 2023).

Imunostimulantes desempenham um importante papel ao ativar o sistema de defesa dos camarões. Representam substâncias capazes de fortalecer a resistência dos animais a doenças infecciosas, agindo sobre o sistema imunológico inespecífico. O uso desses imunostimulantes é tido como uma alternativa eficaz para potencializar a imunidade e aprimorar a capacidade de resistir a uma ampla gama de patógenos (DAWOOD *et al.*, 2020).

Porém até o momento, não há uma definição dos níveis ideais de inclusão desses aditivos para obter esses benefícios específicos. Sendo necessário um maior embasamento científico para determinar com precisão a quantidade necessária de nucleotídeos a ser incluída na alimentação a fim de alcançar os efeitos desejados na imunostimulação.

## **2. Objetivos do trabalho**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito imunostimulante da suplementação com nucleotídeo na resposta imunológica, resistência a doenças, morfologia do hepatopâncreas e contagem de vírios do camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante um desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Determinar os parâmetros hemato-imunológicos dos camarões desafiados ao longo do experimento;
- Avaliar a presença de lesões teciduais sugestivas de infecção por *Vibrio sp.* e morfologia do hepatopâncreas dos animais submetidos as dietas e experimentalmente desafiados com *V. parahaemolyticus* por meio de histologia;
- Determinar a contagem presuntiva total de *Vibrio sp.* no hepatopâncreas dos animais desafiados ao longo do experimento;
- Determinar a taxa de sobrevivência dos camarões submetidos ao desafio bacteriano com o *V. parahaemolyticus*.

3. Artigo científico

Os resultados obtidos durante o trabalho experimental desta dissertação estão apresentados no artigo intitulado “**Efeito imunoestimulante da suplementação com nucleotídeos no camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.”.**

Artigo científico a ser encaminhado a Revista - Aquaculture.  
Todas as normas de redação e citação atendem as estabelecidas pela referida revista (<https://www.journals.elsevier.com/aquaculture>).

**Efeito imunestimulante da suplementação com nucleotídeos no camarão marinho *Penaeus vannamei* mediante desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.**

**Resumo**

A produção de camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) frequentemente enfrenta desafios devido a enfermidades, especialmente infecções bacterianas por *Vibrio*, causando perdas significativas. A suplementação com nucleotídeos surge como uma estratégia para melhorar a imunidade e a sobrevivência dos camarões frente aos desafios bacterianos. Este estudo buscou avaliar o efeito imunestimulante da suplementação com nucleotídeo nos parâmetros hemato-imunológicos, morfologia do hepatopâncreas, contagem presuntiva de vibrios e sobrevivência do *Penaeus vannamei* após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*. Quatro tratamentos foram testados: (R75) adição de 75 mg de nucleotídeo/kg de ração; (R150) adição de 150 mg de nucleotídeo/kg de ração; (R300) adição de 300 mg de nucleotídeo/kg de ração e; (RC) dieta controle, sem adição de nucleotídeos. Após 60 dias de dieta experimental, os camarões foram desafiados, por imersão em suspensão bacteriana de *V. parahaemolyticus* ( $10^6$  UFC/ml) durante 30 dias. Nesse período foram monitorados mortalidade, sinais clínicos e analisados os parâmetros hemato-imunológicos, histológicos e bacteriológicos. Os resultados mostraram que após o período de oferta da dieta, os tratamentos suplementados com nucleotídeos apresentaram melhores desempenhos zootécnicos. Após o desafio bacteriano, as contagens totais e diferenciais de hemócitos apresentaram uma resposta imune aguda em todos os tratamentos, embora sem diferenças significativas. A análise histológica do hepatopâncreas revelou lesões graves, como deformidades nos túbulos e necrose, em todos os tratamentos. As contagens de *Vibrio sp.* no hepatopâncreas diferiram significativamente entre os tratamentos nas coletas dos dias 5 e 15, entre os tratamentos RC e R75 e entre R75 e R300, respectivamente, indicando variações na colonização bacteriana ao longo do tempo. Conclui-se que a suplementação com nucleotídeos favorece o incremento de biomassa e reduz a taxa de mortalidade antes do desafio bacterianos nos tratamentos suplementados com maiores níveis de inclusão (R150 e R300), além de beneficiar a resposta imune aguda após o desafio bacteriano em todos os tratamentos. Entretanto são necessários novos estudos para entender seu efeito sobre o tecido hepatopancreático.

**Palavras-chave:** Camarão branco do Pacífico, imunestimulante, nucleotídeos, vibriose, resposta imune.

## 1. Introdução

A produção de camarão branco do Pacífico (*Penaeus vannamei*) teve crescimento de 52,8% nos últimos cinco anos, tornando-se a espécie de crustáceo mais produzida mundialmente, com 51,7% da produção deste grupo em 2020 (5,8 milhões de toneladas) (FAO, 2022). No Brasil, o cultivo de *P. vannamei* está concentrado na região nordeste, sendo responsável por 99,6% da produção nacional com 112,8 mil toneladas em 2021 (IBGE, 2022).

Entretanto, todo esse potencial produtivo é constantemente limitado pelo surgimento de enfermidades. Agentes infecciosos, como vírus e bactérias, têm resultado em cenários de elevada mortalidade na produção de crustáceos, o que pode resultar em perdas econômicas irreparáveis. No âmbito das bactérias, as espécies do gênero *Vibrio* são responsáveis por muitas doenças em camarões, seja como principal patógeno ou como agentes oportunistas, podendo afetar desde a fase de berçário até a fase de engorda (DE SOUZA VALENTE & WAN, 2021). Diante destes desafios, novas tecnologias, em especial, as voltadas à melhoria do manejo, tornam-se estratégias importantes para mitigar perdas e alavancar a produtividade e crescimento do setor.

Além da melhoria nos sistemas de produção, o uso de aditivos funcionais tem sido bastante incrementado na Aquicultura. Os aditivos funcionais são produtos que tem a finalidade de promover uma melhor saúde e nutrição e, quando utilizados em rações demonstraram contribuir positivamente para a promoção da saúde e do desempenho zootécnico. Além disso, esses aditivos apresentam características menos tóxicas quando comparado ao efeito de antibióticos, representando uma opção economicamente viável e alinhada aos princípios ecológicos (VIJAYARAM *et al.*, 2022).

Um exemplo de aditivo que se mostrou efetivo na aquicultura foram os produtos derivados de leveduras, que quando usados na suplementação alimentar, demonstraram melhora no desempenho zootécnico e na imunidade (LICONA-JAIN *et al.*, 2022; MAHDY *et al.*, 2022). Os produtos de leveduras contêm vários compostos imunostimulantes, como mananoligossacarídeos (MOS),  $\beta$ -glucanos e nucleotídeos, que são capazes de melhorar as respostas imunológicas (AGBOOLA *et al.*, 2021).

Os nucleotídeos são compostos intracelulares, de baixo peso molecular e biologicamente, que desempenham papéis essenciais em processos fisiológicos e bioquímicos (NOVRIADI *et al.*, 2021), como a codificação e decifração de informações genéticas, mediando funções metabólicas e de sinalização celular. Em grande parte, os nucleotídeos têm sua síntese nos tecidos, porém, algumas células imunes e intestinais

requerem este processo e necessitam de suprimentos exógenos (YONG *et al.*; 2020, RAIRAT *et al.*, 2022).

A suplementação com nucleotídeos garante a homeostase e uma maior disponibilidade do nucleotídeo para o organismo, principalmente em um período de alta demanda devido a diversas atividades fisiológicas (DING *et al.*, 2021), sendo registrado especificamente em *P. vannamei*, benefícios no desempenho do crescimento, na eficiência alimentar (ABDEL-RAHIM *et al.*; 2021), desenvolvimento saudável das vilosidades intestinais (MOK *et al.*, 2021) e aumento da resistência ao *Vibrio harveyi* (NOVRIADI *et al.*, 2021) e ao *Vibrio parahaemolyticus* (RAIRAT *et al.*, 2022), além de uma melhoria na taxa de sobrevivência e fortalecimento de respostas imunológicas e humorais demonstradas nestes estudos. Apesar de todos esses benefícios trazidos pelos nucleotídeos, os mecanismos adjacentes a suplementação exógena ainda não é bem documentada.

Sendo assim a suplementação de nucleotídeos como aditivos na alimentação tem a finalidade de imunestimulação, apesar de não haver uma definição sobre quais os níveis de inclusão deste aditivo são necessários para se obter tais benefícios. Por este motivo, o presente estudo visa avaliar o efeito imunestimulante da suplementação com nucleotídeo no crescimento, parâmetros hemato-imunológicos, morfologia do hepatopâncreas, contagem presuntiva de víbrios e sobrevivência do *Penaeus vannamei* após desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Condições experimentais

Para o experimento, pós-larvas negativas por diagnóstico confirmatório de 10 dias (PL<sub>10</sub>) da espécie *P. vannamei* foram adquiridas em larvicultura comercial (Aquatec – Larvicultura de Camarão Marinho, Canguaretama, Rio Grande do Norte) e mantidas em sistema intensivo com densidade de estocagem de 3.000 PL m<sup>-3</sup> (800L) até atingirem o peso médio de 1,78g. A água utilizada foi filtrada (malha de 250 µm) e clorada a 30 ppm (hipoclorito de cálcio com 40% de cloro ativo) e deixada sob aeração para que fosse dechlorada, para ser fertilizada posteriormente.

Para a fertilização, a cada três dias, por um período de 15 dias antes da estocagem, foi aplicado simbiótico, onde a para ativação bacteriana utilizou-se um probiótico comercial, composto por *B. subtilis* - 2,1 x 10<sup>7</sup> UFC/g; *B. licheniformis* – 3,7 x 10<sup>7</sup> UFC/g e *Bacillus sp.* – 2,8 x 10<sup>7</sup> UFC/g), na proporção de 0,5 g de probiótico, 2 g de açúcar e 14 ml de água

do mar limpa esterilizada por m<sup>3</sup> de água do berçário, deixado em processo anaeróbio por 6 horas. Após este período, foi acrescido o farelo de arroz (FR) (20 g/m<sup>3</sup> de água do tanque berçário) mais 200 mL de água limpa/g FR, e deixado por 24 horas no processo de fermentação, em seguida deixado com aeração por mais 24 horas no processo de respiração celular. Após a estocagem das pós-larvas, o simbiótico continuou sendo aplicado a cada 3 dias até os sólidos sedimentáveis atingiram 5 ml/ L, sendo suspenso a aplicação, até a redução dos níveis.

Posteriormente, os juvenis foram aleatoriamente redistribuídos em caixas de 1 m<sup>2</sup>(800 L de volume útil) a uma densidade inicial de 100 camarões m<sup>-2</sup> (125 camarões m<sup>-3</sup>), em um delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições cada. Cada unidade recebeu 200 litros da água do berçário como inóculo e 800 litros de água do mar (33 g L<sup>-1</sup>), mantida com aeração constante e temperatura ambiente. Durante o experimento o pH foi mantido entre 7,5 e 8,0 e a alcalinidade acima de 100 mg CaCO<sub>3</sub>/L corrigido com hidróxido de cálcio e magnésio (cal hidratada – PRNT 80%), na proporção de 10% da ração total ofertada na semana e não houve troca de água, exceto a adição de água doce clorada e desclorada para compensar as perdas por evaporação.

As rações experimentais foram formuladas para atender à necessidade nutricional da espécie com 36% proteína bruta e 6% de lipídeos (Tabela 1). Foram produzidas no Centro Avançado do Pescado Continental – Instituto de Pesca (São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Formulação e composição das dietas, controle e experimentais contendo nucleotídeos, utilizadas para a avaliação do desempenho do *P. vannamei* criados em sistema simbiótico por 60 dias.

Matéria-prima (g kg <sup>-1</sup> )	Dietas (mg kg ração <sup>-1</sup> )			
	RC	R75	R150	R300
Farinha de trigo <sup>a</sup>	180	179,5	179	178
Farinha de soja <sup>b</sup>	150	150	150	150
Proteína concentrada de soja <sup>c</sup>	120	120	120	120
Farinha de vísceras de aves <sup>d</sup>	120	120	120	120
Quirera de arroz <sup>e</sup>	80	80	80	80

Farinha de peixe <sup>f</sup>	60	60	60	60
Hemoglobina <sup>g</sup>	50	50	50	50
Farelo de trigo <sup>e</sup>	50	50	50	50
Sorgo <sup>h</sup>	45	45	45	45
Fosfato dicálcico <sup>i</sup>	23,5	23,5	23,5	23,5
Farinha de Krill <sup>j</sup>	20	20	20	20
Lecitina de soja <sup>k</sup>	22	22	22	22
Cloreto de potássio <sup>l</sup>	10	10	10	10
Óleo de peixe <sup>f</sup>	10	10	10	10
Óleo de soja <sup>b</sup>	10	10	10	10
Sal	10	10	10	10
Nucleotídeo <sup>m</sup>	0	0,5	1	2
Caulino <sup>n</sup>	5,6	5,6	5,6	5,6
Óxido de magnésio <sup>o</sup>	5	5	5	5
Suplemento vitamínico e mineral <sup>p</sup>	5	5	5	5
DL-metionina <sup>q</sup>	5	5	5	5
L-Treonina <sup>r</sup>	5	5	5	5
L-Lisina <sup>s</sup>	5	5	5	5
Nutribinder <sup>t</sup>	5	5	5	5
Fylax (antifúngico) <sup>u</sup>	3	3	3	3
Vitamina C (35%) <sup>v</sup>	0,9	0,9	0,9	0,9
<b>Composição centesimal (g kg<sup>-1</sup>)</b>				
Proteína bruta	366	362	368	366
Lipídio bruto	67	64	64	63
Fibra bruta	46	39	46	44

Cinzas	135	159	160	185
Energia bruta (kcal kg <sup>-1</sup> )	4446	4455	4442	4436

<sup>a</sup> Cidade Bella Moinho/Ponta Grossa-PR; <sup>b</sup> Cooperativa Comigo – Rio Verde-GO; <sup>c</sup> CJ Selecta/Araguari-MG; <sup>d</sup> Frango Rico/Votuporanga-SP; <sup>e</sup> Dallas/Nova Alvorada do Sul-MS; <sup>f</sup> BFP bioprodutos de pescado LTDA / ITAJAÍ-SC; <sup>g</sup> Hemoprot – Lins-SP; <sup>h</sup> Raguife / Santa Fé do Sul-SP Raguife / Santa Fé do Sul-SP; <sup>i</sup> Ecophos - Formiga, MG ; <sup>j</sup> Aker Biomarine Antártica AS (Lysaker, Noruega); <sup>k</sup> Adicel Indústria e Comércio - Ingredientes para Indústrias de Alimentos – Belo Horizonte-MG; <sup>l</sup> Brasil Química Ind. e Com. LTDA / Batatais-SP; <sup>m</sup> Biotide/Biorigin/ Lençóis Paulista, SP; <sup>n</sup> CaO do Brasil Ltda / Iguatama-MG; <sup>o</sup> Biotide - 15% RNA (fonte de nucleotídeos) derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Biorigin/ Lençóis Paulista, SP; <sup>p</sup> Magnésio do Brasil AS / Fortaleza-CE; <sup>q</sup> De Heus nutrição animal – Rio Claro-SP; <sup>r</sup> Rhodimet® NP99 Adisseo a bluestar company; <sup>s</sup> L-Treonina 98% Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda; <sup>t</sup> L-Lisina 78% Ajinomoto do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda; <sup>u</sup> Nutri-Bind Aqua Adisseo a bluestar company; <sup>v</sup> Selko Feed Aditives, <sup>w</sup> Heilongjiang NHU Biotechnology CO.

Os camarões foram alimentados durante 60 dias antes do desafio bacterianos e, os tratamentos foram: (R75) adição de 75 mg de nucleotídeo/kg de ração; (R150) adição de 150 mg de nucleotídeo/kg de ração; (R300) adição de 300 mg de nucleotídeo/kg de ração e; (RC) dieta controle; todos com três repetições cada. Durante a oferta das dietas suplementadas, a taxa de alimentação foi ajustada segundo metodologia de Van Wyk (1999), com uma frequência de fornecimento da dieta 4 vezes ao dia.

As variáveis de qualidade de água foram monitoradas por todo o período do experimento, sendo aferidos diariamente o oxigênio dissolvido (OD), temperatura, pH e salinidade (YSI MODEL 556 MPS, Yellow Springs, OHIO, EUA) às 8 e 16 horas. Os sólidos sedimentáveis (SS) foram mensurados três vezes na semana com auxílio de cone Imhoff (AVNIMELECH, 2012), semanalmente a amônia total, nitrito e alcalinidade (APHA, 2012) foram determinados e, quinzenalmente, nitrato e ortofosfato (APHA, 2012). Todas essas variáveis foram mantidas dentro dos limites fisiológicos de *P. vannamei* segundo Van Wyk & Scarpa (1999) (dados não mostrados).

Os valores médios dos parâmetros de qualidade da água registrados durante o período do desafio bacteriano estão apresentados na tabela 2, não havendo diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). Para aferição desses parâmetros uma amostra da água foi retirada do sistema para ser aferida, não havendo contaminação cruzada pelo uso da sonda.

Tabela 2. Parâmetros da qualidade de água avaliados durante o período do desafio bacteriano (30 dias).

Variáveis	Tratamentos			
	RC	R75	R150	R300

Temperatura (°C)	28,65 ± 0,64 <sup>a</sup>	28,69 ± 0,66 <sup>a</sup>	28,68 ± 0,58 <sup>a</sup>	28,53 ± 0,64 <sup>a</sup>
Salinidade (ppt)	30,91 ± 0,56 <sup>a</sup>	30,61 ± 0,37 <sup>a</sup>	30,66 ± 0,43 <sup>a</sup>	30,82 ± 0,47 <sup>a</sup>
Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	8,50 ± 2,87 <sup>a</sup>	8,41 ± 2,97 <sup>a</sup>	8,06 ± 2,95 <sup>a</sup>	7,84 ± 2,92 <sup>a</sup>
pH	7,24 ± 0,26 <sup>a</sup>	7,37 ± 0,23 <sup>a</sup>	7,34 ± 0,30 <sup>a</sup>	7,38 ± 0,27 <sup>a</sup>
Alcalinidade (mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup> )	102,50 ± 86,30 <sup>a</sup>	97,50 ± 70,80 <sup>a</sup>	102,50 ± 72,40 <sup>a</sup>	85,00 ± 55,80 <sup>a</sup>
N-NH <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0,12 ± 0,16 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,07 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,10 ± 0,07 <sup>a</sup>

Nota: Média ± valores de desvio padrão (mínimo – máximo)

Letras diferentes na mesma linha expressam diferença significativa (p < 0,05).

### Desafio bacteriano

Para o desafio bacteriano, uma cepa liofilizada de *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802) foi obtida na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), ativada e cultivada em Caldo Tripton de Soja (TSB) suplementado com 2% de cloreto de sódio por 24 horas a 30°C, para que se obtivesse o material infeccioso. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 2200 g durante 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e, os pellets, lavados duas vezes e finalmente ressuspensos em solução salina estéril a 2%. A concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml foi determinada utilizando-se como referência a escala de McFarland de 0,5. A partir deste material, a cultura foi diluída para 10<sup>6</sup> UFC/ml, concentração que foi usada no desafio bacteriano.

O desafio bacteriano foi efetuado ao término dos 60 dias de oferta das dietas experimentais, na qual os camarões com peso médio de 8g, foram imersos em suspensão bacteriana contendo aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/ml de *V. parahaemolyticus* por 15 minutos e, em seguida, transferidos para unidades experimentais de 40 L de água clara previamente clorada e decolorada, em sistema de recirculação, a uma densidade de 100 animais m<sup>-2</sup>, onde foi acrescido novo material infeccioso até que se atingisse a concentração final de 10<sup>6</sup> UFC/ml de *V. parahaemolyticus* (TRAN *et al.*, 2013).

O desafio foi mantido por 30 dias e, durante esse período, o manejo das variáveis de qualidade de água foi idêntico ao descrito na etapa anterior, não sendo aferidos apenas os sólidos sedimentáveis por se tratar de água clara. A alimentação continuou com as dietas experimentais, com quantidades ajustadas de acordo com a metodologia de Van Wyk (1999) com a frequência de fornecimento de três vezes ao dia (8, 12 e 16 horas). O delineamento do desafio foi inteiramente casualizado, com quatro repetições para cada tratamento, onde os animais foram monitorados diariamente para a observação da mortalidade, presença de sinais clínicos e para as análises de parâmetros hemato-imunológicos, histológicos e bacteriológicos.

## 2.2. Desempenho zootécnico

Para avaliação do desempenho zootécnico foi realizada a biometria ao início e ao final do período da oferta da dieta experimental e foram determinados: o ganho relativo de peso (%GP=  $100 \times [\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)} / \text{Peso inicial (g)}]$ ), o incremento de biomassa (%GB =  $100 \times [(\text{Biomassa final (kg)} - \text{Biomassa inicial(kg)}) / \text{Biomassa inicial(kg)}]$ ), a taxa de mortalidade (Mort% =  $(\text{n}^\circ \text{ final de camarões} / \text{n}^\circ \text{ inicial de camarões}) \times 100$ ) e a cada 10 dias foi avaliado o crescimento (g). Vale ressaltar que estas variáveis não foram avaliadas durante o período do desafio bacteriano por uma questão de biossegurança.

## 2.3. Parâmetros Hemato-Imunológicos

A análise hemato-imunológica foi realizada antes do desafio experimental e com 24 horas, 72 horas e a cada 5 dias após a inoculação do material infeccioso na água das unidades experimentais. Um animal por unidade experimental teve a hemolinfa coletada para determinação da contagem total e diferencial de hemócitos, segundo o protocolo descrito por Guertler *et al.*, (2013). A hemolinfa foi coletada na hemocele do primeiro segmento abdominal dos animais usando uma seringa de 1 ml contendo solução anticoagulante de Alsever MAS (Solução de Alsever Modificada) (336 mmol L<sup>-1</sup> NaCl; 115 mmol L<sup>-1</sup> glicose; 27 mmol L<sup>-1</sup> citrato de sódio; 9 mmol L<sup>-1</sup> EDTA pH 7,2), na proporção de 1:2 (v:v). Uma alíquota da hemolinfa foi separada e armazenada em MAS a 4% de formaldeído (1:3).

A contagem total de hemócitos (CTH) foi realizada a partir de 100 µL de hemolinfa previamente coletada com anticoagulante e 0,1 µL desta suspensão foi adicionada a câmara de Neubauer para a contagem das células (BEÇAK & PAULETE, 1976). A determinação do número de hemócitos foi efetuada em duplicata usando um microscópio óptico.

Para a determinação da contagem diferencial de hemócitos (CDH) foi adotada a metodologia modificada de Celi *et al.* (2013). Nesta metodologia, 5 µL da suspensão de células de hemócitos fixada em formol a 4% foi espalhada em uma lâmina e seca ao ar e, em seguida, imersa em metanol absoluto por 6 minutos, seguida de solução de Giemsa (diluição 1:10) por 10 minutos, etanol a 70% por 1 minuto e xileno absoluto por 6 minutos. A determinação das porcentagens relativas dos diferentes tipos de hemócitos foi efetuada através de observação da lâmina em microscopia ótica, em triplicata.

## 2.4. Análise Histopatológica

Para análise histopatológica de morfologia do hepatopâncreas e lesões sugestivas de infecção por *V. parahaemolyticus*, quinze animais de cada tratamento foram coletados após o desafio bacteriano. Os animais foram fixados via injeção de solução de Davidson (AFA's), sendo mantidos nesta solução por 70 horas. Em seguida, as amostras foram transferidas para uma solução de etanol a 70%, para posterior preparo das lâminas histológicas, que foram coradas em hematoxilina e eosina (HE), de acordo com procedimento descrito por Lightner (1996). Todas as lâminas foram examinadas em microscópio óptico e as lesões foram analisadas conforme Caro *et al* (2020).

As alterações histológicas dos hepatopâncreas foram avaliadas por análise semiquantitativa, através do cálculo do índice de alteração histológica (IAH), e os danos foram classificados em 3 estágios progressivos de dano tecidual: estágio I (sem efeito na função do órgão), estágio II (dano mais grave e comprometimento da função do órgão) e estágio III (alterações muito graves e irreversíveis de estrutura e função do órgão) (FREGOSO-LÓPEZ *et al.*, 2017) (Tabela 5)

O valor do IAH foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $IAH = [1 \times \Sigma (\text{estágio I})] + [10 \times \Sigma (\text{estágio II})] + [100 \times \Sigma (\text{estágio III})]$ . O IAH médio foi dividido em cinco categorias: 0–10 (funcionamento tecidual normal), 11–20 (alteração leve a moderada), 21–50 (alteração moderada a grave), 51–100 (alteração grave) e > 100 (alteração irreparável) (Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

## 2.5. Análise Microbiológica

Visando determinar a contagem presuntiva total de *Vibrio sp.* no hepatopâncreas dos animais desafiados, antes da inoculação e após a cada 5 dias, um camarão de cada unidade experimental, foi eutanasiado por corte no cordão nervoso, seguido de desinfecção de superfície corporal externa através de imersão em etanol a 70% (15 segundos), solução de hipoclorito de sódio (1,5%) com 0,1% de tween-80 (15 minutos) e em água destilada esterilizada, por três vezes. Cinquenta miligramas do tecido do hepatopâncreas foi macerado e diluído em 4,5 mL de água peptonada tamponada. O produto homogeneizado foi submetido a diluições seriais sucessivas de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$  e semeados (100  $\mu$ L) em Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose (TCBS) (KOBAYASHI *et al.*, 1963), em triplicata. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC/g), utilizando o contador de colônias.

## 2.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software IBM SPSS Statistics versão 27.0.0.0. Os dados foram submetidos aos testes de homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene ( $p \leq 0,05$ ), normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ( $p \leq 0,05$ ). Os dados com distribuição normal e homogênea foram submetidos à ANOVA unidirecional (desempenho zootécnico e IAH) e ANOVA de medidas repetidas (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade e N-NH<sub>3</sub>), seguida pelo teste de Tukey (HSD - *Honest Significant Difference*) para a avaliação de diferenças entre as médias ( $p \leq 0,05$ ). Para a contagem total e diferencial de hemócitos e contagem de bactérias no TCBS, dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ( $p \leq 0,05$ ) com a correção de Bonferroni (Comparação Pairwise) (ZAR, 2013).

### 3. Resultados

#### 3.1. Desempenho zootécnico

Os valores médios do ganho de peso (GP), incremento de biomassa (IB), taxa de mortalidade e crescimento médio (CM) dos camarões submetidos à avaliação da dieta experimental durante 60 dias estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Índices zootécnicos avaliados durante o período de oferta das dietas experimentais.

Variáveis	Tratamentos			
	RC	R75	R150	R300
GP (%)	362,60 ± 19,26 <sup>a</sup>	392,27 ± 19,79 <sup>a</sup>	403,34 ± 14,87 <sup>a</sup>	419,58 ± 9,61 <sup>a</sup>
IB (%)	313,25 ± 18,24 <sup>b</sup>	361,16 ± 21,01 <sup>ab</sup>	368,00 ± 8,80 <sup>ab</sup>	398,71 ± 5,12 <sup>a</sup>
Taxa de mortalidade (%)	10,67 ± 1,53 <sup>a</sup>	6,33 ± 0,58 <sup>ab</sup>	7,00 ± 1,00 <sup>ab</sup>	4,00 ± 1,73 <sup>b</sup>
CM (g)	0,93 ± 0,32 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,51 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,21 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,31 <sup>a</sup>

Nota: GP- Ganho de peso, IB- Incremento de biomassa, CM- crescimento médio a cada 10 dias.

Média ± valores de desvio padrão (mínimo – máximo)

Letras diferentes na mesma linha expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

O IB diferiu entre os tratamentos RC e R300, tendo valores médios de 313,25% e 398,71%, respectivamente. A taxa de mortalidade também apresentou diferenças significativas entre os tratamentos RC e R300, onde a mortalidade foi maior em RC com uma taxa de 10,67% e, menor em R300, com uma taxa de 4%, justificando um maior IB no R300. Em relação ao GP e ao CM não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

#### 3.2. Parâmetros Hemato-Imunológicos

As contagens totais de hemócitos (CTH) realizadas antes e durante o desafio bacteriano estão registradas na tabela 4. Tanto o tratamento RC, sem a suplementação de nucleotídeo, quanto os tratamentos onde houve a suplementação, ocorreu uma queda no CTH após 24 horas da exposição ao *V. parahaemolyticus* (Figura 1). Diferenças significativas entre os tratamentos foram encontrados apenas no dia 1 entre os tratamentos RC e R75 e, no dia 3 entre os tratamentos R75 e R150 após o início do desafio ( $p \leq 0,05$ ). O tratamento RC obteve o maior CTH antes do início da infecção experimental, mas no dia 1 da infecção, a contagem média foi de  $0,88 \times 10^{-6}$  células/ml, sendo a menor entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

As porcentagens de células hialinas (H), semi-granulares (SG) e granulares (G) estão descritas na tabela 4. Na contagem diferencial de hemócitos (CDH) foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos apenas antes do início do desafio. Após o desafio bacteriano, as médias entre os tratamentos foram semelhantes ( $p \leq 0,05$ ). Em todos os tratamentos, a maior prevalência durante todo o período experimental foi de células hialinas.

O percentual de hemócitos hialinos não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). Foram observadas duas quedas no percentual de hemócitos hialinos nos tratamentos R75 e R150 após 24 e 120 horas, respectivamente; enquanto o RC mostrou uma elevação na média no mesmo período, decaindo apenas no 25º dia; o R300 foi o tratamento que apresentou uma maior elevação da média de células hialinas inicialmente, se mantendo na média até o fim do período experimental.

O percentual de células semi-granulares também não apresentou diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ). A incidência deste tipo celular foi maior até 72 horas em todos os tratamentos após a infecção por *V. parahaemolyticus*. As granulares apresentaram as proporções baixas em relação aos outros tipos celulares durante todo o período experimental, não havendo diferença significativa após o início do desafio experimental ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 2. Contagem total de hemócitos (CTH) ( $10^6$  células  $ml^{-1}$ ) e contagem diferencial (CDH) (em porcentagem) dos *Penaeus vannamei* submetidos ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

Dia	Variáveis	Tratamentos			
		RC	R75	R150	R300
0	CTH	$6,68 \pm 3,17^a$	$5,69 \pm 2,97^a$	$5,72 \pm 3,73^a$	$5,73 \pm 3,18^a$
	CDH				
	H	$56,54 \pm 27,26^a$	$71,27 \pm 23,33^a$	$68,81 \pm 21,34^a$	$68,82 \pm 27,44^a$

		SG	39,84 ± 26,69 <sup>a</sup>	25,48 ± 24,25 <sup>a</sup>	28,54 ± 21,41 <sup>a</sup>	28,41 ± 28,38 <sup>a</sup>
		G	3,61 ± 2,48 <sup>a</sup>	3,25 ± 2,73 <sup>a</sup>	2,65 ± 1,34 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,92 <sup>b</sup>
		CTH	0,88 ± 0,44 <sup>b</sup>	2,30 ± 1,19 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,77 <sup>ab</sup>	1,90 ± 1,30 <sup>ab</sup>
1		H	59,40 ± 40,34 <sup>a</sup>	48,16 ± 34,68 <sup>a</sup>	48,27 ± 41,56 <sup>a</sup>	81,44 ± 29,10 <sup>a</sup>
	CDH	SG	39,73 ± 40,53 <sup>a</sup>	50,36 ± 34,75 <sup>a</sup>	50,88 ± 41,96 <sup>a</sup>	17,54 ± 29,49 <sup>a</sup>
		G	0,87 ± 1,06 <sup>a</sup>	1,47 ± 1,12 <sup>a</sup>	0,85 ± 1,78 <sup>a</sup>	1,02 ± 0,63 <sup>a</sup>
		CTH	1,90 ± 1,28 <sup>a</sup>	3,09 ± 2,13 <sup>a</sup>	2,94 ± 2,25 <sup>a</sup>	1,28 ± 0,90 <sup>a</sup>
3		H	90,57 ± 13,13 <sup>a</sup>	94,87 ± 4,80 <sup>a</sup>	94,13 ± 6,35 <sup>a</sup>	85,20 ± 10,59 <sup>a</sup>
	CDH	SG	7,83 ± 12,14 <sup>a</sup>	3,94 ± 5,06 <sup>a</sup>	3,77 ± 4,91 <sup>a</sup>	12,69 ± 10,63 <sup>a</sup>
		G	1,60 ± 2,96 <sup>a</sup>	1,19 ± 1,62 <sup>a</sup>	2,10 ± 2,32 <sup>a</sup>	2,10 ± 1,86 <sup>a</sup>
		CTH	1,23 ± 0,66 <sup>ab</sup>	2,21 ± 0,44 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,75 <sup>b</sup>	1,98 ± 0,74 <sup>ab</sup>
5		H	97,32 ± 2,86 <sup>a</sup>	78,51 ± 41,39 <sup>a</sup>	69,81 ± 44,94 <sup>a</sup>	89,45 ± 28,24 <sup>a</sup>
	CDH	SG	1,07 ± 2,45 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,59 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,91 <sup>a</sup>
		G	1,61 ± 1,13 <sup>a</sup>	1,43 ± 1,16 <sup>a</sup>	2,69 ± 3,21 <sup>a</sup>	1,94 ± 1,73 <sup>a</sup>
		CTH	2,27 ± 1,14 <sup>a</sup>	3,44 ± 2,95 <sup>a</sup>	2,49 ± 2,82 <sup>a</sup>	1,56 ± 0,49 <sup>a</sup>
10		H	97,69 ± 1,58 <sup>a</sup>	97,52 ± 1,11 <sup>a</sup>	95,50 ± 2,86 <sup>a</sup>	94,73 ± 5,75 <sup>a</sup>
	CDH	SG	0,62 ± 1,40 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,38 <sup>a</sup>	1,75 ± 1,97 <sup>a</sup>	3,28 ± 6,09 <sup>a</sup>
		G	1,68 ± 1,42 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,80 <sup>a</sup>	2,75 ± 2,14 <sup>a</sup>	2,00 ± 1,17 <sup>a</sup>
		CTH	3,95 ± 4,21 <sup>a</sup>	*	1,43 ± 0,94 <sup>a</sup>	2,99 ± 3,11 <sup>a</sup>
15		H	98,41 ± 1,83 <sup>a</sup>	*	96,25 ± 4,74 <sup>a</sup>	98,17 ± 1,48 <sup>a</sup>
	CDH	SG	0,58 ± 1,12 <sup>a</sup>	*	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,63 <sup>a</sup>
		G	1,01 ± 0,93 <sup>a</sup>	*	3,75 ± 4,74 <sup>a</sup>	1,55 ± 1,59 <sup>a</sup>
		CTH	3,29 ± 2,12 <sup>a</sup>	2,30 ± 1,30 <sup>a</sup>	1,27 ± 0,69 <sup>a</sup>	2,34 ± 1,47 <sup>a</sup>
20		H	97,54 ± 1,76 <sup>a</sup>	97,65 ± 1,38 <sup>a</sup>	89,50 ± 18,20 <sup>a</sup>	94,39 ± 10,32 <sup>a</sup>
	CDH	SG	0,27 ± 0,54 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,61 <sup>a</sup>	9,46 ± 17,69 <sup>a</sup>	3,27 ± 9,02 <sup>a</sup>
		G	2,20 ± 1,74 <sup>a</sup>	2,07 ± 1,33 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,97 <sup>a</sup>	2,34 ± 1,94 <sup>a</sup>
25		CTH	2,80 ± 4,08 <sup>a</sup>	2,89 ± 2,41 <sup>a</sup>	1,96 ± 1,61 <sup>a</sup>	1,95 ± 1,36 <sup>a</sup>

	H	93,72 ± 10,77 <sup>a</sup>	92,49 ± 20,53 <sup>a</sup>	98,31 ± 1,97 <sup>a</sup>	96,63 ± 2,59 <sup>a</sup>	
CDH	SG	1,55 ± 5,37 <sup>a</sup>	6,40 ± 20,87 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,83 ± 1,98 <sup>a</sup>	
	G	4,73 ± 5,68 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,98 <sup>a</sup>	1,66 ± 1,97 <sup>a</sup>	2,54 ± 1,83 <sup>a</sup>	
CTH		133 ± 0,78 <sup>a</sup>	2,45 ± 4,12 <sup>a</sup>	2,83 ± 2,30 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,87 <sup>a</sup>	
30	H	95,07 ± 11,26 <sup>a</sup>	95,24 ± 8,18 <sup>a</sup>	97,45 ± 2,96 <sup>a</sup>	90,24 ± 13,77 <sup>a</sup>	
	CDH	SG	3,14 ± 10,43 <sup>a</sup>	2,77 ± 7,32 <sup>a</sup>	0,26 ± 0,74 <sup>a</sup>	7,56 ± 14,79 <sup>a</sup>
		G	1,79 ± 1,73 <sup>a</sup>	1,99 ± 2,32 <sup>a</sup>	2,29 ± 2,37 <sup>a</sup>	2,21 ± 1,84 <sup>a</sup>

Nota: \*- amostras não viáveis, H- Hialinas, SG- Semi-granulares, G- Granulares

Média ± valores de desvio padrão (mínimo – máximo)

Letras diferentes na mesma linha expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Análise histopatológica e mortalidade cumulativa

A análise histopatológica do hepatopâncreas dos camarões desafiados com *V. parahaemolyticus* revelou alterações histológicas nos três estágios de acordo com o índice de alteração histológica (IAH) (Tabela 5). Os estágios indicaram as alterações histológica, sendo relevante observar que a taxa de alteração irreparável foi superior no tratamento RC (60%) quando comparado aos outros tratamentos. Dentre os tratamentos, a maior taxa de alterações moderada a grave foi observada no tratamento R300 (85,7%) em relação aos demais tratamentos. Em relação ao IAH não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 3. Percentual e valores médios do Índice de Alteração Histopatológica (IAH) do hepatopâncreas de *Penaeus vannamei* submetidos ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

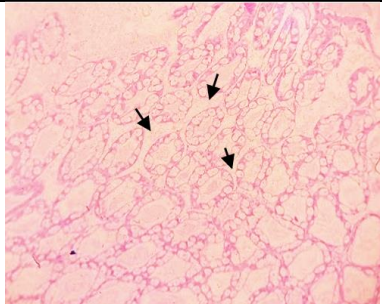
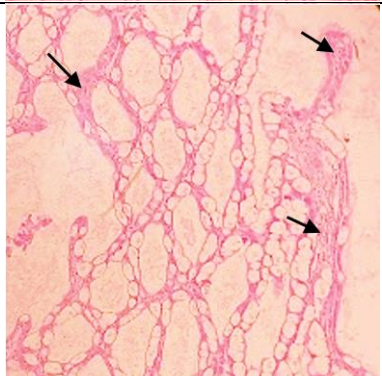
Estágios	Categorias	Tratamento			
		RC	R75	R150	R300
I	Funcionamento normal do tecido	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	Alteração leve a moderada	0,0%	0,0%	6,7%	0,0%
II	Alteração moderada a grave	40,0%	60,0%	60,0%	85,7%

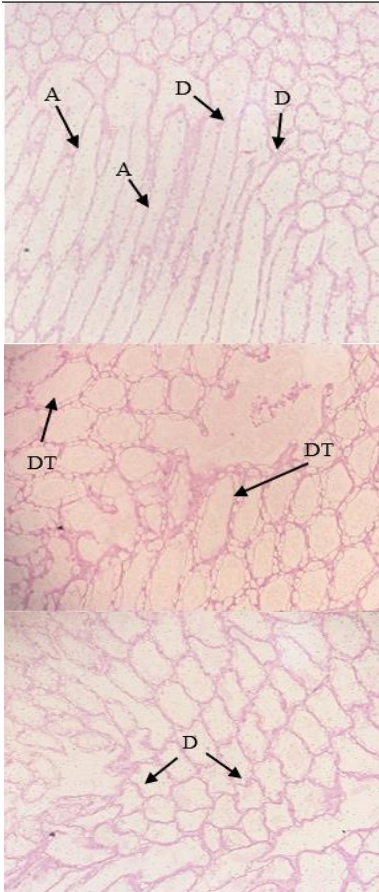
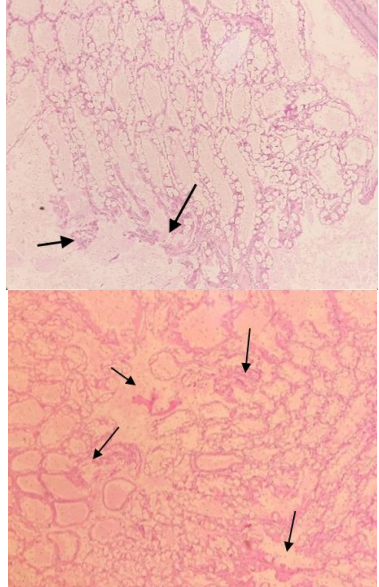
	Alteração grave	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
III	Alteração irreparável	60,0%	40,0%	33,3%	14,3%
	IAH	80,00 ±	64,87 ±	64,20 ±	47,43 ±
		47,35 <sup>a</sup>	44,37 <sup>a</sup>	44,22 <sup>a</sup>	36,08 <sup>a</sup>

Nota: Estágio I (funcionamento normal do tecido), Estágio II (Alteração leve a moderada, alteração moderada a grave e alteração grave), Estágio III (alteração irreparável). O IAH médio foi dividido em cinco categorias: 0-10 (funcionamento normal do tecido), 11-20 (leve a moderada alteração), 21-50 (alteração moderada a grave), 51-100 (grave alteração) e > 100 (alteração irreparável).

Os achados histológicos estão descritos na tabela 6. Todos os tratamentos apresentaram infiltrações hemocíticas em diferentes proporções e em diferentes regiões do hepatopâncreas. O RC e o R150 apresentaram, na maior parte dos tecidos analisados, infiltrações periféricas discretas e com maior incidência de hemócitos granulares. O R75 apresentou, em sua maioria, uma infiltração moderada, mais espalhada pelo hepatopâncreas, também com predominância dos hemócitos granulares. O R300 apresentou uma infiltração semelhante aos tratamentos RC e R150 diferindo apenas por apresentar menor quantidade de hemócitos hialinos em comparação aos demais tratamentos.

Tabela 4. Classificação das alterações encontradas no hepatopâncreas de *Penaeus vannamei* examinadas ao final do desafio com *Vibrio parahaemolyticus*.

Alteração	Classificação	
Edema Estágio I	Intensa (>2/3 do campo) Moderada (1/3 -2/3 do campo) Discreta (< 1/2 do campo)	
Infiltração hemocítica Estágio I	Intensa (>40% do campo) Moderada (10-40% do campo) Discreta (< 10% do campo)	

<p>Deformação (D)/ Alongamento (A)/ Dilatação dos túbulos (DT) Estágio II</p>	<p>Intensa (&gt;2/3 do campo) Moderada (1/3 -2/3 do campo) Discreta (&lt; 1/2 do campo)</p>	
<p>Necrose Estágio II (Discreta) Estágio III</p>	<p>Intensa (&gt;2/3 do campo) Moderada (1/3 -2/3 do campo) Discreta (&lt; 1/2 do campo)</p>	

A mortalidade cumulativa ao longo do desafio bacteriano não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, variando entre 29 e 33%. O maior pico de mortalidade ocorreu no 5° dia em todos os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) (Tabela 7).

Tabela 5. Mortalidade cumulativa (%) de *Penaeus vannamei* ao longo do desafio bacteriano com *Vibrio parahaemolyticus*.

Variáveis	Tratamentos				
	RC	R75	R150	R300	
Número inicial de animais	88	88	88	88	
Mortalidade cumulativa	Dia 1	0	0	0	0
	Dia 5	17	20	17	16
	Dia 10	19	25	22	22
	Dia 15	36	33	34	31
	Dia 20	42	41	47	39
	Dia 25	48	45	53	43
	Dia 30	57	53	59	55
Médias	31,29 ± 20,05 <sup>a</sup>	31,29 ± 20,05 <sup>a</sup>	33,14 ± 21,37 <sup>a</sup>	29,43 ± 18,41 <sup>a</sup>	

Nota: Média ± valores de desvio padrão (mínimo – máximo)

Letras diferentes na mesma linha expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Análise Microbiológica

As contagens médias presuntivas totais de *Vibrio sp.* em TCBS nas amostras de hepatopâncreas de *P. vannamei* durante o desafio experimental estão descritas na tabela 8. Foram encontradas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos apenas nas coletas dos dias 5 e 15. Na primeira coleta, dia 5 após o início do desafio, as diferenças significativas foram entre os tratamentos RC e R75 e entre R75 e R300, sendo a contagem média do RC maior do que R75 ( $p \leq 0,05$ ). As contagens variaram de 0 (zero) a  $2,00 \times 10^5$  UFC/g no RC, 0 (zero) a  $5,00 \times 10^7$  UFC/g no R300, enquanto no R75 a contagem foi 0 (zero) UFC/g.

Na terceira coleta, a diferença significativa foi entre os tratamentos RC e R150, sendo a contagem média do R150 maior em comparação com o RC ( $p \leq 0,05$ ). As contagens foram de 0 (zero) UFC/g para o RC e para o R150 tendo mínima de 0 (zero) e máxima de  $3,00 \times 10^8$  UFC/g.

Na segunda (10 dias) e quarta (20 dias) coletas não houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. Na quinta (25 dias) e sexta (30 dias), as contagens foram de 0 (zero) UFC/g para todos os tratamentos.

A contagem presuntiva por percentual de sacarose (Tabela 8) não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

Tabela 6. Contagem bacteriana total ( $10^6$  células/ml) e presuntiva de vibrionáceas por tratamento (percentual de sacarose) em TCBS em *Penaeus vannamei* (hepatopâncreas) ao longo do desafio bacteriano.

Dias	Tratamentos			
	RC	R75	R150	R300
0	1,01 ± 0,90 <sup>a</sup>	1,96 ± 1,79 <sup>a</sup>	1,93 ± 1,41 <sup>a</sup>	1,05 ± 1,00 <sup>a</sup>
5	0,07 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,28 ± 0,60 <sup>ab</sup>	6,78 ± 14,80 <sup>a</sup>
10	60,89 ± 15,21 <sup>a</sup>	6,3 ± 15,21 <sup>a</sup>	12,61 ± 28,19 <sup>a</sup>	1,77 ± 3,69 <sup>a</sup>
15	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	0,68 ± 1,40 <sup>ab</sup>	31,16 ± 91,62 <sup>a</sup>	0,57 ± 1,30 <sup>ab</sup>
20	0,05 ± 0,17 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,90 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,68 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,02 <sup>a</sup>
25	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
30	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
Percentual de sacarose				
Positiva	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	95,04 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
Negativa	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	4,96 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>

Nota: Média ± valores de desvio padrão (mínimo – máximo)

Letras diferentes na mesma linha expressam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

O aumento expressivo na biomassa observado no tratamento R300 em comparação com o tratamento RC (313,25% vs. 398,71%) sugere que a suplementação com uma maior inclusão de nucleotídeos teve um efeito positivo no incremento de biomassa. Este resultado é consistente com estudos anteriores que indicam os potenciais benefícios da suplementação com nucleotídeos na promoção do crescimento em camarões (NOVIADRI *et al.*, 2021; HE *et al.*, 2023). Os nucleotídeos são moléculas essenciais para a síntese de DNA e RNA em camarões, influenciando processos como replicação celular e regeneração de tecidos. Eles também desempenham papéis cruciais na codificação genética, função metabólica e

sinalização celular. Além disso, têm impacto na imunidade, resistência a infecções, crescimento, função intestinal e hepática, além de proteção contra o estresse e dano ao DNA. Sua importância sugere potenciais aplicações terapêuticas e nutricionais. (DING et al., 2021). Ao colonizar o trato digestivo favorecem a absorção de nutrientes e maior resistência a doenças (JAVAHERY *et al.*, 2019).

Com uma maior absorção de nutrientes, a suplementação traz um aporte imunológico, com isto a taxa de mortalidade durante a fase de oferta da dieta apresentou menor no tratamento R300. O tratamento RC registrou uma taxa de mortalidade superior (10,67%), enquanto o tratamento R300 mostrou uma taxa significativamente menor (4%). Essa diferença sugere que a suplementação com nucleotídeos pode estar associada a uma maior resistência dos camarões a fatores estressantes, refletindo em uma redução nas taxas de mortalidade (Novriadi *et al.*, 2021).

Um dos mecanismos da resposta imune do *P. vannamei* está associado aos hemócitos (CTH), que são responsáveis pelo encapsulamento, coagulação, melanização, fagocitose; atuando diretamente no sítio infeccioso e no combate aos organismos patogênicos. (LIN & SÖDERHÄLL, 2011; SÖDERHÄLL *et al.*, 2016; LU, *et al.*, 2021). No presente estudo observou-se que tanto os camarões do tratamento controle (RC), sem suplementação de nucleotídeos, quanto os dos tratamentos suplementados apresentaram uma queda no total de hemócitos (CTH) após 24 horas da exposição ao *V. parahaemolyticus*. Essa diminuição inicial pode indicar uma resposta imune aguda frente ao desafio bacteriano, caracterizada pela mobilização de hemócitos para combater a infecção.

Vale ressaltar que diferenças significativas nos CTH foram detectadas apenas em dois pontos temporais específicos: após 24 horas entre os tratamentos RC e R75, e após 5 dias entre os tratamentos R75 e R150. Essas variações podem sugerir uma resposta diferencial dos camarões à suplementação com diferentes doses de nucleotídeos, influenciando em uma maior síntese e liberação de hemócitos pelo tecido hematopoiético, sugerindo a eficácia da resposta imune ao longo do tempo (LIN & SÖDERHÄLL, 2011).

Devido ao efeito imunostimulante da suplementação com nucleotídeos, é esperado um aumento na CTH quando se compara animais suplementados e animais sem suplementação, no entanto, no presente estudo, não houve diferenças significativas entre os grupos suplementados e grupo controle, o que vai de encontro a estudos anteriores, como no estudo de Abdel-Rahim *et al.* (2021), onde foi feito uso de 0,5 g/kg de nucleotídeo associado a uma macroalga e houve um aumento significativo no CTH, este fator pode ter potencializado o efeito da ação imunológica do nucleotídeo.

Os hemócitos circulantes na hemolinfa apresentam formas e funções distintas. Atuam tanto no sistema imune inato, quanto em funções fisiológicas. Os hemócitos hialinos atuam na fagocitose; os semi-granulares atuam no encapsulamento, na citotoxicidade, no armazenamento e liberação do sistema proPO; os granulares atuam na melanização, peptídeos antimicrobianos e citotoxicidade, sendo a principal defesa contra patógenos (LIN & SÖDERHÄLL, 2011; SULEMAN *et al.*, 2019; VOGT, 2022).

Eventos infecciosos requisitam um grande número de hemócitos, principalmente os granulares e semi-granulares, que dão início a uma complexa ação de defesa, onde a partir de uma degranulação estimulam a fagocitose pelas células hialinas (JOHANSSON *et al.*, 2000). Este processo de degranulação resulta em morte celular e consequente diminuição temporária dos hemócitos providos de grânulos circulantes na hemolinfa (LIU *et al.*, 2021), que são rapidamente restaurados pela síntese e liberação pelo tecido hematopoiético (LIN & SÖDERHÄLL, 2011). Desta forma uma maior prevalência de células hialinas é esperada diante de um quadro infeccioso, corroborando os resultados deste estudo, onde houve a predominância de células hialinas.

Apesar de não haver diferenças significativas entre as médias das CDH dos tratamentos, é possível observar o efeito da suplementação com imunestimulantes nas contagens das células semi-granulares e granulares dos camarões suplementados. Segundo Javahery, *et al.* (2019) as células granulares e semi-granulares obtiveram melhores níveis e de Mulyadi, *et al.* (2020) onde as hialinas e semi-granulares foram dominantes, a suplementação com imunestimulante também teve ação nas células granulares.

A infecção por vírios pode causar danos ao hepatopâncreas e outros tecidos e órgão limitando assim a função de metabolismo, transporte e catabolismo. O sistema imune necessita de altas quantidades de energia no combate a agentes infecciosos. Esta energia está contida nas reservas lipídicas presentes no hepatopâncreas (JARC & PETAN, 2019; YIN *et al.*, 2022). Como o uso de imunestimulantes favorece a absorção de nutriente, o esperado seria um alto armazenamento lipídico e uma maior resistência a ação dos patógenos dos camarões suplementados em contraste com o grupo não suplementado. Porém no presente estudo, foi observado baixo armazenamento lipídico, deformações dos túbulos e necrose em todos os tratamentos. Em outro estudo sinais como atrofia e armazenamento lipídico baixo também foi observado no grupo controle positivo e no grupo com baixa inclusão (0,25g/kg) de nucleotídeos (RAIRAT *et al.*, 2022), sendo necessário mais estudos em relação ao efeito da suplementação sobre o hepatopâncreas.

A análise das contagens médias presuntivas totais de *Vibrio sp.* nas amostras de hepatopâncreas de *Penaeus vannamei* durante o desafio experimental fornece importantes percepções sobre a dinâmica da colonização bacteriana neste órgão e sua relação com os diferentes tratamentos aplicados. Os resultados revelaram que em diferentes momentos as contagens bacterianas do tratamento RC obtiveram médias significativamente mais elevadas que os demais tratamentos suplementados com nucleotídeos após inoculação do *Vibrio parahaemolyticus*, demonstrando o efeito causado pela suplementação que já havia sido observado em outros estudos (RAIRAT *et al.*, 2022)

Estudos sobre a resposta imune de camarões desafiados com *Vibrio spp.*, avaliaram a infecção através do desafio via injeção, havendo uma deficiência em estudos que avaliem a resposta imune de camarões infectado com *Vibrio spp.* por imersão (SEGARRA *et al.*, 2023; LICONA-JAIN *et al.*, 2022), desta forma a avaliação feita por este estudo tem grande importância visto que se assemelha a forma de contágio nas carcinoculturas, trazendo um cenário mais próximo a realidade.

## **5. Conclusões**

A suplementação com 300 mg de nucleotídeo/ kg de ração melhorou o ganho de biomassa e reduziu a taxa de mortalidade dos camarões antes do desafio bacteriano. Houve uma resposta imune aguda ao desafio, mas sem diferenças significativas entre os grupos. As análises histológicas revelaram alterações moderadas a graves no hepatopâncreas, independentemente dos níveis de inclusão, sugerindo a necessidade de estudos adicionais para entender melhor a ação da suplementação sobre o tecido hepatopancreático, os mecanismos subjacentes à resposta imune, à eficácia da suplementação com nucleotídeos.

## **Declaração de contribuição de autoria**

Katharine Batista Santos de Souza: Investigação, Metodologia, Análise formal, Curadoria de dados, Redação - versão original. Danielle Alves da Silva: Curadoria de dados, Redação - revisão. Gisely Karla de Almeida Costa: Curadoria de dados, Redação – revisão. Luis Otavio Brito: Concepção, Metodologia, Redação – revisão e edição, Fernando Leandro dos Santos: Metodologia, Redação – revisão e edição, Rodrigo Antônio Ponce de Leon Ferreira de Carvalho: Metodologia, Redação – revisão e edição, Giovanni Sampaio Gonçalves: Metodologia, Redação – revisão e edição, João Fernando Albers Koch: Recursos, Metodologia, Redação – revisão e edição, Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva: Supervisão, Concepção, Metodologia, Recursos, Redação – revisão e edição.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedido pela Biorigin (Açucareira Quatá S.A.), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro sob a forma de bolsas (números de processo: 88887.673328/2022-00; 88887.912924/2023-00; 88887.601775/2021-00; Código de Financiamento 001) durante a realização do presente estudo. O CNPq também concedeu bolsa a Luis Otavio Brito (PQ309669/2021-9).

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não há interesses financeiros concorrentes ou relações pessoais que possam ter influenciado os resultados relatados nesse artigo.

## **Referências**

Abdel-Rahim, M.; Bahattab, O.; Nossir, F.; Al-Awthan, Y.; Khalil, R. H.; Mohamed, R. (2021). 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**, 19(3), 175.

Abiri, S. A.; Chitsaz, H.; Najdegerami, E. H.; Akrami, R.; Jalali, A. S. (2022). Influence of wheat and rice bran fermentation on water quality, growth performance, and health status of Common carp (*Cyprinus carpio* L.) juveniles in a biofloc-based system. **Aquaculture**, 555, 738168.

Agboola, J. O.; Overland, M.; Skrede, A.; Hansen, J. O. (2021). Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. **Reviews in Aquaculture**, 13(2), 949-970.

APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22nd ed. Washington, DC. American Public Health Association; American Water Works Association; **Water Environment Federation**, 2012.

Avnimelech, Y. (2012). Biofloc Technology. A Practical Guide Book. Louisiana (US). **World Aquaculture Society**.

Beçak, W., & Paulete, J. (1976). Cytology and histology techniques. Rio de Janeiro: **Scientific and Technical Books Editora**.

Butt, U. D.; Lin, N.; Akhter, N.; Siddiqui, T.; Li, S.; Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, *114*, 263-281.

Caro, L. F. A., Mai, H. N., Noble, B., & Dhar, A. K. (2020). Acute hepatopancreatic necrosis disease (VPAHPND), a chronic disease in shrimp (*Penaeus vannamei*) population raised in latin America. **Journal of invertebrate pathology**, *174*, 107424.

Celi, M.; Filiciotto, F.; Parrinello, D.; Buscaino, G.; Damiano, M. A.; Cuttitta, A.; D'Angelo, S.; Mazzola, S.; Vazzana, M. (2013). Physiological and agonistic behavioural response of *Procambarus clarkii* to an acoustic stimulus. **Journal of Experimental Biology**, *216*(4), 709-718.

de Souza Valente, C.; Wan, A. H. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. **Journal of Invertebrate Pathology**, *181*, 107527.

Ding, T.; Song, G.; Liu, X.; Xu, M.; Li, Y. (2021). Nucleotides as optimal candidates for essential nutrients in living organisms: A review. **Journal of Functional Foods**, *82*, 104498.

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. **Towards Blue Transformation. Rome**, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc046>

Fregoso-López, M. G., Morales-Covarrubias, M. S., Franco-Nava, M. A., Ramírez-Rochín, J., Fierro-Sañudo, J. F., Ponce-Palafox, J. T., & Páez-Osuna, F. (2017). Histological alterations in gills of shrimp *Litopenaeus vannamei* in low-salinity waters under different stocking densities: Potential relationship with nitrogen compounds. **Aquaculture Research**, *48*(12), 5854-5863.

Guertler, C.; Rieg, T.; Mejía-Ruíz, C. H.; Lehmann, M.; Barracco, M. A.; & Perazzolo, L. M. (2013). Hemogram and survival rate of marine shrimp after silencing of WSSV by RNA interference. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, *48*, 983-990.

He, X.; Abakari, G.; Tan, H.; Wenchang, L. I. U.; Luo, G. (2023). Effects of different probiotics (*Bacillus subtilis*) addition strategies on a culture of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology (BFT) aquaculture system. **Aquaculture**, 566, 739216.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA—IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2022. **Produção da Pecuária Municipal**, 2022.

Jarc, E., & Petan, T. (2019). Focus: Organelles: Lipid droplets and the management of cellular stress. **The Yale journal of biology and medicine**, 92(3), 435.

Javahery, S.; Noori, A.; Hoseinifar, S. H. (2019). Growth performance, immune response, and digestive enzyme activity in Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* Boone, 1931, fed dietary microbial lysozyme. **Fish & shellfish immunology**, 92, 528-535.

Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., & Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. **Aquaculture**, 191(1-3), 45-52.

Khanjani, M. H.; Mozanzadeh, M. T.; Sharifinia, M.; Emerenciano, M. G. C. (2023). Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties. **Aquaculture**, 562, 738757.

Kobayashi, T. (1963). A new selective isolation medium for the *Vibrio* group; on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). **Jpn. J. Bacteriol.**, 18, 387-392.

Licon-Jain, A.; Racotta, I.; Angulo, C.; Luna-González, A.; Escamilla-Montes, R.; Cortés-Jacinto, E.; Morelos-Castro, R. M.; Campa-Córdova, Á. I. (2022). Combined administration routes of marine yeasts enhanced immune-related genes and protection of white shrimp (*Penaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 124, 192-200.

Lightner, D. V. (1996). A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp.

Lin, X., & Söderhäll, I. (2011). Crustacean hematopoiesis and the astakine cytokines. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, 117(24), 6417-6424.

Liu, M. J., Liu, S., & Liu, H. P. (2021). Recent insights into hematopoiesis in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology Reports**, 2, 100040.

Lu, J.; Shi, Y.; Yao, T.; Bai, C.; Jiang, J.; Ye, L. (2021). Gender differences in hemocyte immune parameters of Hong Kong oyster *Crassostrea hongkongensis* during immune stress. **Frontiers in Immunology**, 12, 659469.

Mahdy, M. A.; Jamal, M. T.; Al-Harb, M.; Al-Mur, B. A.; Haque, M. F. (2022). Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 10(5), 59-65.

Mok, W. Y.; Yong, A. S. K.; Mohamad Lal, M. T.; Shapawi, R.; Kim, Y. S. (2021). Dietary guanosine-monophosphate improves growth performance, feed utilization and intestinal morphology of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) maintained on soybean meal-based diets. **Aquaculture Research**, 52(4), 1453-1462.

Mulyadi, I. N.; Iba, W. (2020). Efficacy of seaweed (*Sargassum* sp.) extract to prevent vibriosis in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juvenile. **International Journal of Zoological Research**, 16.

Novriadi, R.; Ilham, I.; Roigé, O.; Segarra, S. (2021). Effects of dietary nucleotides supplementation on growth, total haemocyte count, lysozyme activity and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, 21, 100840.

Panigrahi, A.; Esakkiraj, P.; Saranya, C.; Das, R. R.; Sundaram, M.; Sudheer, N. S.; Biju, I. F.; Jayanthi, M. (2022). A biofloc-based aquaculture system bio-augmented with probiotic bacteria *Bacillus tequilensis* AP BFT3 improves culture environment, production performances, and proteomic changes in *Penaeus vannamei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 14(2), 277-287.

Panigrahi, A.; Das, R. R.; Sarkar, S.; Aravind, R.; Rekha, P. N.; Sandeep, K. P. (2023). Biofloc-based farming of Indian white shrimp, *Penaeus indicus*, in recirculating aquaculture system (RAS) enriched with rotifers as feed supplement. **Aquaculture International**, 31(2), 657-680.

Poleksić, V., & Mitrović-Tutundžić, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish, 339-352.

Rairat, T.; Chuchird, N.; Keetanon, A.; Carcano, P.; Comi, M.; Koppe, W. (2022). Effects of dietary yeast-derived nucleotide and RNA on growth performance, survival, immune

responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Reports**, 27, 101352.

Segarra, S., Chau, T., Hoang, P., & Tran, L. (2023). Immunoregulation and Resistance to Aquatic Pathogens with Dietary Nucleotides in Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Fishes**, 8(6), 308.

Söderhäll, I. (2016). Crustacean hematopoiesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 129-141.

Sriphuttha, C.; Limkul, S.; Pongsetkul, J.; Phiwthong, T.; Massu, A.; Sumniangyen, N.; Boontawan, P.; Ketudat-Cairns, M.; Boontawan, A.; Boonchuen, P. (2023). Effect of fed dietary yeast (*Rhodotorula paludigena* CM33) on shrimp growth, gene expression, intestinal microbial, disease resistance, and meat composition of *Litopenaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, 147, 104896.

Suleman, S.; Andayani, S.; Yuniarti, A. (2019). Potential of *Ulva lactuca* Crude Extract in Increasing Total Haemocyte Count (THC) and Fagocytic Activity in Vaname Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan**, 10(1), 01-07.

Tran, L.; Nunan, L.; Redman, R. M.; Mohney, L. L.; Pantoja, C. R.; Fitzsimmons, K.; Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. **Diseases of aquatic organisms**, 105(1), 45-55.

Vijayaram, S., Sun, Y. Z., Zuorro, A., Ghafarifarsani, H., Van Doan, H., & Hoseinifar, S. H. (2022). Bioactive immunostimulants as health-promoting feed additives in aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**.

Van Wyk, P. (1999). Nutrition and feeding of *Litopenaeus vannamei* in intensive culture systems. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, 220.

Van Wyk, P., & Scarpa, J. (1999). Water quality requirements and management. **Farming marine shrimp in recirculating freshwater systems**, 4520, 141-161.

Vogt, G. (2022). Cytology, function and dynamics of stem and progenitor cells in decapod crustaceans. **Biological Reviews**, 97(2), 817-850.

Yin, X., Zhuang, X., Liao, M., Huang, L., Cui, Q., Liu, C., & Wang, W. (2022). Transcriptome analysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas

challenged by *Vibrio alginolyticus* reveals lipid metabolic disturbance. **Fish & Shellfish Immunology**, 123, 238-247.

Yong, A. S. K.; Mok, W. Y.; Tamrin, M. L. M.; Shapawi, R.; Kim, Y. S. (2020). Effects of dietary nucleotides on growth, survival and metabolic response in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* against ammonia stress condition. **Aquaculture Research**, 51(6), 2252-2260.

Zar, J. H. Biostatistical Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, 2013.

#### 4. Considerações finais

- Este estudo oferece contribuições valiosas para entender a interação entre a suplementação com nucleotídeos e a resposta imune de camarões *Penaeus vannamei* submetidos ao desafio com *Vibrio parahaemolyticus*, visto que se trata de uma enfermidade comum na carcinicultura responsável por muitas perdas econômicas.
- Ao utilizar a abordagem da infecção por imersão na observação da interação entre camarões e patógeno, foi possível avaliar de forma mais precisa a realidade da carcinicultura. Embora haja uma carência em estudos que avaliem a infecção por este método em estudos anteriores.
- A suplementação com nucleotídeos mostrou-se promissora na melhoria do desempenho e na redução da mortalidade dos camarões.
- As contagens de células sanguíneas demonstraram uma resposta imune aguda em momentos diferentes, porém sem significância estatística.
- Alterações histológicas se mostraram presentes em todos os tratamentos, independente do tratamento analisado.
- O estudo deixou evidente que a suplementação com nucleotídeos pode ter um impacto variável na resistência a doenças, sendo associado as condições do cultivo dos camarões.
- São necessários estudos mais aprofundados para elucidar completamente os efeitos da suplementação e otimizar seu uso na aquicultura.

#### 5. Referências

Abdel-Rahim, M.; Bahattab, O.; Nossir, F.; Al-Awthan, Y.; Khalil, R. H.; Mohamed, R. (2021). 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**, *19*(3), 175.

Abiri, S. A.; Chitsaz, H.; Najdegerami, E. H.; Akrami, R.; Jalali, A. S. (2022). Influence of wheat and rice bran fermentation on water quality, growth performance, and health status of Common carp (*Cyprinus carpio* L.) juveniles in a biofloc-based system. **Aquaculture**, *555*, 738168.

Agboola, J. O.; Overland, M.; Skrede, A.; Hansen, J. O. (2021). Yeast as major protein-rich ingredient in aquafeeds: a review of the implications for aquaculture production. **Reviews in Aquaculture**, *13*(2), 949-970.

Butt, U. D.; Lin, N.; Akhter, N.; Siddiqui, T.; Li, S.; Wu, B. (2021). Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, *114*, 263-281.

Dawood, M. A.; El-Shamaa, I. S.; Abdel-Razik, N. I.; Elkomy, A. H.; Gewaily, M. S.; Abdo, S. E.; Solimand, A. A.; Paraye, B. A.; Abdelkhalek, N. (2020). The effect of mannanoligosaccharide on the growth performance, histopathology, and the expression of immune and antioxidative related genes in Nile tilapia reared under chlorpyrifos ambient toxicity. **Fish & shellfish immunology**, *103*, 421-429.

de Souza Valente, C.; Wan, A. H. (2021). *Vibrio* and major commercially important vibriosis diseases in decapod crustaceans. **Journal of Invertebrate Pathology**, *181*, 107527.

Ding, T.; Song, G.; Liu, X.; Xu, M.; Li, Y. (2021). Nucleotides as optimal candidates for essential nutrients in living organisms: A review. **Journal of Functional Foods**, *82*, 104498.

Ernesto Ceseña, C., Vega-Villasante, F., Aguirre-Guzman, G., Luna-Gonzalez, A., & Campa-Cordova, A. (2021). Update on the use of yeast in shrimp aquaculture: a minireview. **International Aquatic Research**, *13*(1), 1-16.

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. **Towards Blue Transformation**. Rome, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc046>

Gao, S., Pan, L., Huang, F., Song, M., Tian, C., & Zhang, M. (2019). Metagenomic insights into the structure and function of intestinal microbiota of the farmed Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, 499, 109-118.

Gyan, W. R., Ayiku, S., Yang, Q., & Asumah, J. (2019). Effects of yeast antimicrobial peptide in aquaculture. **J Fish Aquac Dev**, 6(1048), 2577-1493.

He, X.; Abakari, G.; Tan, H.; Wenchang, L. I. U.; Luo, G. (2023). Effects of different probiotics (*Bacillus subtilis*) addition strategies on a culture of *Litopenaeus vannamei* in biofloc technology (BFT) aquaculture system. **Aquaculture**, 566, 739216.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA—IBGE. Produção da Pecuária Municipal 2022. **Produção da Pecuária Municipal**, 2022.

Jach, M. E., Serefko, A., Ziaja, M., & Kieliszek, M. (2022). Yeast protein as an easily accessible food source. **Metabolites**, 12(1), 63.

Khanjani, M. H.; Mozanzadeh, M. T.; Sharifinia, M.; Emerenciano, M. G. C. (2023). Biofloc: A sustainable dietary supplement, nutritional value and functional properties. **Aquaculture**, 562, 738757.

Kumar, S.; Verma, A. K.; Singh, S. P.; Awasthi, A. (2023). Immunostimulants for shrimp aquaculture: paving pathway towards shrimp sustainability. **Environmental Science and Pollution Research**, 30(10), 25325-25343.

Licona-Jain, A.; Racotta, I.; Angulo, C.; Luna-González, A.; Escamilla-Montes, R.; Cortés-Jacinto, E.; Morelos-Castro, R. M.; Campa-Córdova, Á. I. (2022). Combined administration routes of marine yeasts enhanced immune-related genes and protection of white shrimp (*Penaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 124, 192-200.

Mahdy, M. A.; Jamal, M. T.; Al-Harb, M.; Al-Mur, B. A.; Haque, M. F. (2022). Use of yeasts in aquaculture nutrition and immunostimulation: A review. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 10(5), 59-65.

Mohamad, N., Amal, M. N. A., Yasin, I. S. M., Saad, M. Z., Nasruddin, N. S., Al-saari, N. & Sawabe, T. (2019). Vibriosis in cultured marine fishes: a review. **Aquaculture**, 512, 734289.

Mok, W. Y.; Yong, A. S. K.; Mohamad Lal, M. T.; Shapawi, R.; Kim, Y. S. (2021). Dietary guanosine-monophosphate improves growth performance, feed utilization and intestinal morphology of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) maintained on soybean meal-based diets. **Aquaculture Research**, 52(4), 1453-1462.

Mondal, H., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., & Thomas, J. (2022). Viral infections in cultured fish and shrimps: current status and treatment methods. **Aquaculture international**, 30(1), 227-262.

Novriadi, R.; Ilham, I.; Roigé, O.; Segarra, S. (2021). Effects of dietary nucleotides supplementation on growth, total haemocyte count, lysozyme activity and survival upon challenge with *Vibrio harveyi* in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture Reports**, 21, 100840.

Panigrahi, A.; Das, R. R.; Sarkar, S.; Aravind, R.; Rekha, P. N.; Sandeep, K. P. (2023). Biofloc-based farming of Indian white shrimp, *Penaeus indicus*, in recirculating aquaculture system (RAS) enriched with rotifers as feed supplement. **Aquaculture International**, 31(2), 657-680.

Panigrahi, A.; Esakkiraj, P.; Saranya, C.; Das, R. R.; Sundaram, M.; Sudheer, N. S.; Biju, I. F.; Jayanthi, M. (2022). A biofloc-based aquaculture system bio-augmented with probiotic bacteria *Bacillus tequilensis* AP BFT3 improves culture environment, production performances, and proteomic changes in *Penaeus vannamei*. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 14(2), 277-287.

Peña-Navarro, N., Castro-Vásquez, R., Vargas-Leitón, B., & Dolz, G. (2020). Molecular detection of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in *Penaeus vannamei* shrimps in Costa Rica. **Aquaculture**, 523, 735190.

Rairat, T.; Chuchird, N.; Keetanon, A.; Carcano, P.; Comi, M.; Koppe, W. (2022). Effects of dietary yeast-derived nucleotide and RNA on growth performance, survival, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* infection in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Reports**, 27, 101352.

Satyarup, D., Kumar, M., Dalai, R. P., Mohanty, S., & Rathor, K. R. (2020). Theories of disease causation: an overview. **Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology**, 14(4), 8075-8079.

Tacon, A. G. (2020). Trends in global aquaculture and aquafeed production: 2000–2017. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, 28(1), 43-56.

Yong, A. S. K.; Mok, W. Y.; Tamrin, M. L. M.; Shapawi, R.; Kim, Y. S. (2020). Effects of dietary nucleotides on growth, survival and metabolic response in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* against ammonia stress condition. **Aquaculture Research**, 51(6), 2252-2260.

Zheng, Y., Yu, M., Liu, J., Qiao, Y., Wang, L., Li, Z., Zhang, X. & Yu, M. (2017). Bacterial community associated with healthy and diseased Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and rearing water across different growth stages. **Frontiers in microbiology**, 8, 1362.