

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Levedura, parede celular de levedura e levedura  
selenizada na saúde e desempenho produtivo de  
pacu e tilápia-do-Nilo**

**Thiago Fernandes Alves Silva**

**Jaboticabal – São Paulo**

**2019**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Levedura, parede celular de levedura e levedura  
selenizada na saúde e desempenho produtivo de  
pacu e tilápia-do-Nilo**

**Thiago Fernandes Alves Silva**

**Orientadora: Dra. Fabiana Pilarski**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

**Jaboticabal – São Paulo**

**2019**

S586l Silva, Thiago Fernandes Alves  
Levedura, parede celular de levedura e levedura selenizada na  
saúde e desempenho produtivo de pacu e tilápia-do-Nilo / Thiago  
Fernandes Alves Silva. -- Jaboticabal, 2019  
x, 129 p. : tabs., fotos., il.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de  
Aquicultura, 2019

Orientadora: Fabiana Pilarski

Coorientador: Salvador Arijó

Banca examinadora: Diogo Teruo Hashimoto, Leonardo  
Susumu Takahashi, Geovana Dotta Tamashiro, José Eurico  
Possebon Cyrino

Bibliografia

1. Nutrição animal. 2. Peixes tropicais. 3. Prebióticos. 4.  
Nutracêuticos. I. Título. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.043

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA TESE:** Levedura, parede celular de levedura e levedura selenizada na saúde e desempenho produtivo de pacus e tilápias-do-Nilo

**AUTOR: THIAGO FERNANDES ALVES SILVA**

**ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI**

**COORIENTADOR: SALVADOR ARIJO ANDRADE**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI  
Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP



Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO  
CAUNESP / UNESP / FCAV - Jaboticabal



Prof. Dr. LEONARDO SUSUMU TAKAHASHI  
Curso de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena



Pós-Doutoranda GEOVANA DOTTA TAMASHIRO  
. / Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP



Prof. Dr. JOSÉ EURICO POSSEBON CYRINO  
Departamento de Zootecnia / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA LUIZ DE QUEIROZ - USP

Jaboticabal, 22 de fevereiro de 2019

## SUMÁRIO

RESUMO GERAL .....	1
GENERAL ABSTRACT .....	2
CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	3

### **Capítulo 1. O uso de *Saccharomyces cerevisiae* e seus derivados na aquicultura**

RESUMO .....	10
1. Introdução .....	11
2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	13
3. Colonização intestinal .....	16
4. <i>S. cerevisiae</i> na aquicultura .....	17
4.1. Valor nutritivo e desempenho produtivo.....	18
4.2. Fatores limitantes ao emprego da levedura como alimento .....	20
4.3. <i>S. cerevisiae</i> como imunoestimulante.....	22
4.4. Imunomoduladores derivados de <i>S. cerevisiae</i> .....	25
4.4.1. Parede celular de Levedura, $\beta$ -glucano e MOS.....	25
4.4.2. Nucleotídeos .....	29
4.4.3. Levedura selenizada .....	31
5. Conclusão .....	36
6. Referências Bibliográficas.....	37

### **Capítulo 2. Efeito sinérgico da levedura selenizada e da parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho produtivo e na resposta imunológica do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

RESUMO .....	65
1. INTRODUÇÃO .....	67
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	69
2.1. Período de alimentação .....	69
2.2. Dieta .....	70
2.3. Desempenho produtivo.....	71
2.4. Morfometria intestinal.....	71
2.5. Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	72
2.6. Análises imunológicas .....	72

2.6.1. Atividade respiratória dos leucócitos ( <i>burst oxidativo</i> ), Lisozima e Complemento (Via alternativa) .....	72
2.7. Indicadores de estresse .....	73
2.7.1. Cortisol e Glicemia .....	73
2.8. Análise Estatística.....	73
3. RESULTADOS.....	73
4. DISCUSSÃO.....	78
5. REFERENCIAS.....	83

**Capítulo 3. Efeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, parede celular de levedura e levedura selenizada no desempenho produtivo e resposta imunológica de tilápia-do-Nilo**

RESUMO .....	94
1. INTRODUÇÃO .....	95
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	96
2.1. Dieta .....	96
2.2. Condições Experimentais .....	98
2.3. Desempenho produtivo .....	98
2.5. Desafio com <i>Aeromonas hydrophila</i> .....	99
2.6. Atividade respiratória dos leucócitos ( <i>Burst oxidativo</i> ), Atividade sérica da lisozima e Atividade hemolítica do sistema complemento (Via alternativa) .....	99
2.7. Cortisol e Glicemia.....	100
2.8. Análise Estatística.....	101
3. RESULTADOS.....	101
4. DISCUSSÃO.....	109
5. REFERÊNCIAS.....	113

**Dedico,**

À minha avó Brulina Francisca (*in memorian*) com todo meu amor e gratidão.

Aos meus pais, Pedro Fernandes e Maria de Sousa, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida. Pai e mãe, após este trabalho meu sonho de construir uma vida melhor para vocês estará mais perto.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Pedro e Maria, por tudo o que representam para mim, pela simplicidade, caráter, exemplo de vida, educação e carinho. Obrigado pela ajuda nos momentos difíceis e entender minha ausência todos estes anos.

À minha noiva, Nathana, por confiar e me apoiar nas decisões difíceis todos estes anos. Por estar sempre presente, me ajudar nas necessidades e compartilhar tantos momentos de alegria. Chegar até esse ponto só foi possível com sua ajuda. Te amo.

À minha orientadora e amiga, Dra. Fabiana Pilarski. Obrigado pela confiança, incentivo, ajuda e apoio em todos os momentos ao longo do doutorado. Saiba que admiro sua alegria e carisma que me tranquilizam a cada conversa. Pela sua ética, profissionalismo e respeito, sempre a levarei como maior exemplo profissional.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica e Fisiologia de Peixes (família LAFIPE), pela ajuda nas incontáveis coletas, biometrias e análises nestes e nos experimentos paralelos à minha tese, Prof. Elizabeth Urbinati, Damares, Rudney, Mariana Maluli, Allana, Raissa, Aurea, Camila, Adriana e Larissa. Serei sempre grato, pois sei que sem vocês este trabalho não sairia do papel.

Aos grandes amigos que fiz durante a pós-graduação, Inácio, Raphael, Yvana, Rodrigo, Daiane, Eli, Evandro, Valeria e, em especial, ao estagiário Gabriel que sem ter nenhuma obrigação, me ajudou em todas as etapas do trabalho.

A todos os amigos que a fotografia me trouxe, em especial sou grato à Letícia, Luiz e Malu por me proporcionarem tantos momentos de alegria e me ajudar na construção de planos que utilizarei na minha vida. Vocês são amigos incríveis.

Aos meus bons e velhos amigos, em especial, Fernando, Carlos, Gelson, Allan, Renata, Marquim, Gregory, Day, Pii, Gabriel, Henriles e até mesmo o Beira Mar. A cada dia eu os admiro mais e vejo como são pessoas boas, únicas e incomparáveis.

Aos colegas do LAPOA pela ajuda nos momentos pessoais e profissionais mais difíceis que atravessei durante o doutorado: Suzana Kotzent, Lindomar de Oliveira Alves, Gustavo Moraes Ramos Valladão, Silvia Umeda Gallani, Fernando Rodrigues, Daiane Venci, Raphael, Yvana, Inacio e Rodrigo.

Aos representantes das empresas que gentilmente me forneceram insumos, Daniela Nomura (Trouw Nutrition), Fabiana Traldi (Ceresco), Gustavo Costa e Renato (Imeve), Marcelo (Phileo) e Fábio (Vitafort).

Aos funcionários do Caunesp, Mayara, Elisandra, Mônica, Silvinha, David, Su e, em especial aos meus amigos, Valdecir, Márcio, Luiz e Donizete, pela ajuda durante o trabalho pesado do doutorado.

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Unesp (Caunesp), pela oportunidade para a realização do doutorado.

Este trabalho não é resultado apenas do esforço individual. Ele nasceu de significativas contribuições que recolhi durante minha trajetória acadêmica e como cidadão, ao lidar com pessoas e instituições que foram fundamentais à essa construção. Por isto, agradeço à todos aqueles que de algum modo contribuíram de forma positiva para a realização deste trabalho e de forma injusta não foram citados aqui.

“A simplicidade é o último degrau da sabedoria”.

Khalil Gibran

## **APOIO FINANCEIRO**

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

## RESUMO GERAL

A expansão da aquicultura baseia-se em cultivos cada vez mais intensivos aumentando a exposição dos animais às elevadas condições de estresse, comprometendo o sistema imunológico e fazendo com que se tornem alvos de patógenos. A utilização de alimentos funcionais apresenta boas perspectivas quanto a melhora no desempenho produtivo e resistência às doenças na aquicultura. Entretanto, seus mecanismos de atuação ainda são pouco conhecidos. Por isto, o presente estudo avaliou o efeito do uso de aditivos derivados de levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, no cultivo de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*). Inicialmente foi avaliado o uso de parede celular de levedura e levedura selenizada (fonte de selênio orgânico) no cultivo de pacus. Os animais foram distribuídos em grupos que receberam dietas controle, com parede de levedura, levedura selenizada, levedura selenizada + parede celular de levedura. Neste experimento, os animais que receberam levedura selenizada na dieta mostraram melhores resultados para a atividade respiratória dos leucócitos e lisozima. O uso da parede de levedura elevou o cortisol. Entretanto, o uso de levedura selenizada juntamente com parede celular de levedura manteve elevadas as respostas imunológicas. Um segundo experimento foi realizado com a utilização de parede celular de levedura, levedura selenizada e levedura viva (*S. cerevisiae*) no cultivo de tilápias-do-Nilo. O uso em conjunto dos imunoestimulantes testados incrementaram o sistema imunológico inato da tilápia, entretanto, concluímos que o uso da parede celular de levedura requer precauções quanto à sua utilização, uma vez que pode elevar o nível de cortisol plasmático no sangue dos peixes.

**PALAVRAS-CHAVE:** aquicultura, selênio-levedura, alimento funcional; imunoestimulantes.

## GENERAL ABSTRACT

The expansion of aquaculture is based on increasingly intensive crops increasing the exposure of animals to high stress conditions, compromising the immune system and causing them to become targets of pathogens. The use of functional foods shows good prospects regarding the improvement in productive performance and resistance to diseases in aquaculture. However, their mechanisms of action are still poorly understood. Therefore, the present study evaluated the effect of the use of yeast-derived additives, *Saccharomyces cerevisiae*, on the cultivation of pacus (*Piaractus mesopotamicus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Initially, the use of yeast and selenized yeast cell walls (source of organic selenium) in the cultivation of pacus was evaluated. The animals were distributed in groups that received control diets, with yeast wall, selenized yeast, selenized yeast + yeast cell wall. In this experiment, animals that received selenized yeast in the diet showed better results for the respiratory activity of leukocytes and lysozyme. The use of the yeast wall elevated the cortisol. However, the use of selenized yeast along with yeast cell wall maintained high immunological responses. A second experiment was carried out with the use of yeast cell wall, selenized yeast and living yeast (*S. cerevisiae*) in the cultivation of Nile tilapia. The combined use of the immunostimulants tested increased the innate immune system of the tilapia, however, we concluded that the use of the yeast cell wall requires precautions regarding its use, since it can increase the level of plasma cortisol in the blood of the fish.

**KEY-WORDS:** aquaculture, selenium-yeast, functional food, immunostimulants.

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A piscicultura apresenta contínuo crescimento no cenário mundial (FAO, 2018). Entretanto, o estresse promovido pelas atuais condições de criação impede o máximo potencial produtivo dos peixes e abre portas para a multiplicação e invasão de patógenos que muitas vezes se propagam entre fazendas de produção através da água do cultivo, causando mortalidade, perdas econômicas e riscos ambientais (Nayak, 2010; Cerezuela et al., 2012; Telli et al., 2014; Ben Hamed et al., 2018). No Brasil, a piscicultura apresenta as mesmas perspectivas de crescimento do cenário mundial, com a criação de peixes representando 70,9% do pescado produzido, totalizando  $507 \times 10^3$ t em 2016 (IBGE, 2016).

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) (LINNAEUS, 1758), é o segundo peixe de água doce mais produzido no mundo, sendo superado apenas pela criação de carpas (FAO, 2018). No Brasil, esta é a espécie de maior importância econômica com  $239 \times 10^3$ t despescadas em 2016, representando 47,1% do total de peixes produzidos no País (IBGE, 2016). Outra espécie de destaque na piscicultura brasileira é o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (HOLMBERG, 1887), uma espécie oriunda das bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, mas que tem uma vasta distribuição pelo país (Castagnolli, 1992). Tanto a tilápia quanto o pacu apresentam ótimas características de produção para regiões tropicais, como rápida taxa de crescimento, adaptabilidade aos diversos sistemas de criação e boa aceitação de mercado consumidor (Zimmermann e Fitzsimmons, 2004; Bombardelli e Hayashi, 2005; Jomori et al., 2005; Urbinati, Gonçalves e Takahashi, 2010).

Nos peixes, o trato intestinal acomoda uma ampla variedade de microrganismos, entre eles patógenos oportunistas provenientes da dieta e da água circundante e por isto, deve manter a integridade anatômica e funcional de suas frágeis estruturas e apresentar um sistema imune efetivo para impedir eventual invasão por agentes infecciosos (Elia e Souza, 2001; Ringø et al., 2010; Makesh et al., 2015).

A bactéria gram-negativa *Aeromonas hydrophila* é parte integrante da microbiota intestinal de peixes e é um dos principais patógenos na aquicultura (Singh et al., 2008; Stratev et al., 2015). Em animais imunossuprimidos, este

microrganismo provoca septicemia hemorrágica, caracterizada pela presença de lesões e hemorragias, principalmente nos órgãos internos, brânquias e opérculos, com elevadas taxas de mortalidade (Castro-Escarpulli et al., 2003; Garcia e Moraes, 2009). Ainda, este patógeno merece atenção por ser eventualmente transmitido aos seres humanos, através do contato com a água ou peixes contaminados (Zhang et al., 2003; Parker et al., 2011).

É conhecido que o fortalecimento dos mecanismos imunológicos e a criação de barreiras à permanência de microrganismos indesejáveis ao longo do trato intestinal pode dificultar a ação de patógenos e prevenir surtos de mortalidade nas pisciculturas (Deivasigamani e Subramanian, 2016; Wang et al., 2016; Das et al., 2017; Dawood et al., 2017; Jahangiri e Esteban, 2018). Por isto, nos últimos anos, inúmeras pesquisas foram feitas em busca da avaliação de alimentos funcionais e da compreensão de seus mecanismos de atuação (Ringø et al., 2010; Cruz et al., 2012; Ringø et al., 2012; Barman et al., 2013; Navarrete e Tovar-Ramírez, 2014; Song et al., 2014; Akhter et al., 2015; Carbone e Gaggio, 2016; Dawood e Koshio, 2016; Bahi et al., 2017; Hoseinifar et al., 2018). Embasando a indústria de alimentos quanto à fabricação, logística, comercialização e administração de compostos imunoestimulantes em diferentes etapas da criação dos peixes.

Assim, este trabalho teve como objetivo inicial, descrever os principais mecanismos de atuação da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, e dos seus componentes celulares utilizados como imunoestimulantes na aquicultura. Em seguida, buscou-se avaliar o efeito do uso em conjunto da parede celular de levedura e levedura selenizada (fonte de selênio orgânico) na criação do pacu. Os resultados encontrados mostraram importantes benefícios do uso destes aditivos funcionais. Entretanto, encontramos resultados inesperados e por isto, um segundo experimento foi realizado para testar novas hipóteses. Neste segundo experimento, avaliamos novamente o uso dos aditivos anteriormente testados e acrescentamos o uso de levedura viva em busca da compreensão dos mecanismos de atuação destes alimentos funcionais na criação da tilápia-do-Nilo.

## REFERÊNCIAS

Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. Probiotics and prebiotics associated with **Aquaculture**: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.2, p.733–741, 2015.

Barman D.; Nen P.; Mandal S.C.; Kumar V., Immunostimulants for **Aquaculture**. **Health Management. Journal of Marine Science: Research & Development**. v.134, n.3, 2013.

Ben Hamed, S.; Ranzani-Paiva, M.J.; Tachibana, L.; Dias, D.C.; Ishikawa, C.A; Estaban, M.A., Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. **Fish & Shellfish Immunology**. v.80, p.550–562, 2018.

Bombardelli, R.A.; Hayashi, C.; Natali, M.R.M.; Sanches, E.A.; Piana, P.A.; (2009). Desempenho reprodutivo e zootécnico e deposição de lipídios nos hepatócitos de fêmeas de tilápia-do-nilo alimentadas com rações de diversos níveis energéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.8, p1391-1399, 2009.

Carbone, D.; Faggio, C., Importance of prebiotics in **Aquaculture** as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 54, p. 172-178, 2016.

Castagnolli, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep. p. 89, 1992.

Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M.J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Fernandez-Rendon, E.; Aparicio, G.O.; Guarro, J.; Chacon, M.R., Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**. v. 84, p. 41–49, 2003.

Cerezuela, R.; Guardiola F.A.; Meseguer, J.; Esteban, M. A., Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus Aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1032-1040, 2012.

Cruz, P. M.; Ibáñez, A. L.; Hermosillo, O. A. M.; Saad, H. C. R., Use of Probiotics in Aquaculture. **International Scholarly Research Network**. 2012.

Das, S.; Mondal, K., Haque. S., A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of **Aquaculture**. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.5, n.2, p.422-429. 2017.

Dawood, M. A. O., Koshio, S.; Esteban, M. Á., Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in **Aquaculture**: a review. **Reviews in Aquaculture**, v.10, n.4, p.950-974. 2017.

Dawood, M. A. O.; e Koshio, S., Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp **Aquaculture**: A review. **Aquaculture**, v.454, p.243–251, 2016.

Deivasigamani, B.; Subramanian, V., Applications of Immunostimulants in **Aquaculture**: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied**. v.5, n.9, p.447-453, 2016.

Elia, C. C. S.; Souza, H. S. P., **Imunologia da mucosa intestinal: da bancada ao leito**. São Paulo: Editora Atheneu, p.197, 2001.

FAO, Food and Aquiculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**, Rome. 2018.

Garcia, F.; Moraes, F. R., Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p.17-21, 2009.

Hoseinifar, S. H.; Sun, Y-Z.; Wang, A.; Zhou, Z., Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v.9, p. 2429, 2018.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária municipal. Rio de Janeiro: **IBGE, 2016**. Disponível em <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html>: Acesso em: 05 jan. 2019.

Jahangiri, L.; Esteban, M. A.; Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review. **Fishes**. v.3, n.33, 2018.

Jomori R. K.; Carneiro D. J.; Martins M. I. E. G.; Portella M. C., Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**. v.243, p.175-183, 2005.

Makesh, M.; Sudhesh, P. S.; Cain, K. D., Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated flavobacterium psychrophilum vaccine strain by different routes. **Fish & Shellfish Immunology**. 44, 156-163, 2015.

Navarrete, P.; Tovar-Ramírez, D., Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture Sustainable. **Aquaculture Techniques** (Hernandez-Vergara, M. ed.), pp. 135–172, 2014.

Nayak, S. K.; Mukherjee, S. C., Screening of gastrointestinal bacteria of Indian major carps. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 7, p. 1034–1041, 2011.

Parker, J. L.; Shaw, J. G., *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal on Information Security**, v.62, p.109–118, 2011.

Ringø, E.; Olsen, R.; Gifstad, T.; Dalmo, R.; Amlund, H.; Hemre, G.; Bakke, A., Prebiotics in **Aquaculture**: a review. **Aquaculture Nutrition**. v.16: p.117-136, 2010.

Ringø, E.; Rolf, R.E.; Vecino, J.L.G.; Wadsworth, S.; Song, S.K., Use of immunostimulants and nucleotides in **Aquaculture**: a review. **Journal of Marine Science: Research & Development**. v.2, n.1, p.1000104, 2012.

Singh, V.; Rathore, G.; Kapoor, D.; Mishra, B. N.; Lakra, W. S., Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. **Indian Journal of Microbiol**, v.48, p.453-458, 2008.

Song, S. K.; Beck, B. R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H. D.; Ringø, E., Prebiotics as immunostimulants in **Aquaculture**: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v.40, n.1, p.40–48. 2014.

Stratev, D.; Stoev, S.; Vashin, I.; Daskalov, H., Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with

*Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, p.191–202, 2015.

Telli, G. S.; Ranzani-Paiva, M. J. T.; Dias, D. de C.; Sussel, F. R.; Ishikawa, C. M.; Tachibana, L., Dietary administration of *Bacillus subtilis* on hematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. **Fish & Shellfish Immunology**, v.39, n.2, p.305–311, 2014.

Urbinati, E. C.; Goncalves, F. D.; Takahashi, L. S., Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: Balsisseroto, B.; Gomes, L. C., **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, segunda edição. Santa Maria: Editora UFSM, v. único, p.205-244, 2010.

Wang W.; Sun, J.; Liu, C.; Xue, Z., Application of immunostimulants in **Aquaculture**: current knowledge and future perspectives. **Aquaculture Research**, v.48, p. 1–23, 2017.

Zhang, Y. L.; Lau, Y. L.; Arakawa, E.; Leung, K. Y., Detection and genetic analysis of group II capsules in *Aeromonas hydrophila*. **Microbiology**, v.149, p.1051–1060, 2003.

Zimmermann, S.; Fitzsimmons, k., Tilapicultura intensiva. In: Cyrino, J. E. P.; Urbinati, E. C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, C., (Eds.). **Tópicos Especiais em piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**, TecArt, p.533, 2004.

## **CAPÍTULO 1**

### **O uso de *Saccharomyces cerevisiae* e seus derivados na aquicultura**

## O uso de *Saccharomyces cerevisiae* e seus derivados na aquicultura

### RESUMO

*Saccharomyces cerevisiae* é a levedura mais utilizada como alimento funcional na aquicultura. Seus efeitos benéficos consistem em melhora na integridade intestinal, no desempenho produtivo, resposta imunológica, resistência ao estresse e atividade antioxidante. Sua capacidade de bioenriquecimento com selênio, os nucleotídeos e imunossacarídeos presentes em sua composição, como  $\beta$ -glucanos e mananoligossacarídeos têm modos distintos de atuação sobre o desempenho produtivo e a saúde de peixes e podem ser utilizados como produtos comerciais independentes em busca de efeitos específicos. A presente revisão contempla de forma abrangente o modo de atuação da levedura *S. cerevisiae* em sua forma íntegra ou dos seus componentes funcionais na produção de peixes. Foi feita uma compilação de trabalhos que abordam a utilização da levedura sobre os aspectos biotecnológicos, nutricionais e imunológicos, assim como, os principais mecanismos envolvidos na sua atuação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Aquicultura; Selênio-levedura; Alimento funcional; Imunoestimulante

## 1. Introdução

A aquicultura é o setor da produção animal que mais cresce no mundo. Entre 1961 e 2016 a atividade cresceu em média 3,2% ao ano, superando a produção de carne de todos os animais terrestres combinados (2,8%) e fornecendo 53% do pescado utilizado para alimentação humana (FAO, 2018).

Apesar da redução na taxa de crescimento nos últimos anos, a aquicultura apresenta ótimas perspectivas para o futuro, impulsionada pela introdução de novas espécies, avanços nas técnicas de criação, pelo crescimento populacional e sua demanda por proteína animal de alta qualidade e pela carência de pescado oriunda da pesca extrativa, reflexo da gestão inadequada da atividade pesqueira (Fao, 2013; Schlag e Ystgaard, 2013; Bush et al., 2018; Bush e Oosterveer., 2019; Brooks e Conkle, 2019).

A elevada intensificação da produção aquícola ao longo dos anos elevou o tempo de exposição dos animais à condição de estresse, comprometendo o sistema imunológico e tornando-os alvos de patógenos como vírus, bactérias, fungos e parasitos (Nayak, 2010; Cerezuela et al., 2012; Telli et al., 2014; Ben Hamed et al., 2018). A utilização indiscriminada e sem critérios de antimicrobianos na prevenção de doenças ou como promotores de crescimento, resultam em poluição ambiental (Ganner e Schatzmayr, 2012; Ayandiran et al., 2014), no acúmulo de resíduos de fármaco nos peixes (Lim e Webster, 2006), e promovem a resistência de microrganismos patógenos (Wood, Gold e Moellring-Jr, 1996; Balcázar et al., 2006), representando também risco para a saúde humana (Kersarcodi-Watson et al., 2008).

Neste contexto, a busca por alternativas ao uso de antimicrobianos despertou o interesse das instituições de pesquisa e do mercado para a avaliação de suplementos dietéticos funcionais que promovam uma melhoria na resposta imunológica e no desempenho produtivo de peixes (Cruz et al., 2012; Barman et al., 2013; Navarrete et al., 2014; Carbone e Gaggio, 2016; Hoseinifar et al., 2018). Dentre estes produtos, a levedura *S. cerevisiae* e seus derivados celulares como, a parede celular,  $\beta$ -glucanos, mananoligossacarídeos (MOS) e nucleotídeos destacam-se por seus efeitos positivos na criação de peixes e já se consolidam

como importantes componentes dietéticos em sistemas intensivos de criação (Das et al., 2017; Dawood et al., 2017; Wang et al., 2017; Jahangiri e Esteban, 2018).

Na aquicultura, células vivas de *S. cerevisiae* são utilizadas como alimento funcional promovendo benefícios na restauração da homeostase intestinal, no combate à infecção por patógenos e no aumento da resposta imune inata, desempenho produtivo e controle de aflatoxinas em peixes e camarões (Abdel-Tawwab et al., 2008; Selim, El-hofy e Khalil, 2013). Além disso, as leveduras têm a vantagem de não serem afetadas por fármacos bactericidas, o que pode ajudar no restabelecimento da microbiota normal após o tratamento com estes fármacos (Perez-Sanchez et al., 2013).

As leveduras também são capazes de assimilar elevadas concentrações minerais do ambiente que podem ser incorporados a aminoácidos em pouco tempo, tornando-os mais disponíveis quando fornecidos em dietas de animais (Schrauzer, 2000; Tapiero et al., 2003; Rayman, 2008; Mansour et al., 2017; Guo et al., 2018). Sua parede celular contém importantes polissacarídeos que estimulam a resposta imunológica no organismo hospedeiro (Minami, et al., 2011; Vallejos-Vidal et al 2016), e atuam como um prebiótico ou seja, um componente alimentar não digerível que estimula seletivamente o crescimento e a atividade de um número limitado de espécies bacterianas já residentes no trato intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995; Dimitroglou et al., 2009).

São notáveis na literatura científica a grande quantidade de benefícios promovidos pelos aditivos funcionais na saúde dos animais cultivados (Tafalla, Børgwald e Dalmo, 2013; Lazado et al., 2014; Ramos et al., 2015; Spring et al., 2015; Deivasigamani e Subramanian, 2016; Giri et al., 2016; Vallejos-Vidal et al., 2016; Nawaz et al., 2018). Embora estes estudos forneçam informações importantes sobre as consequências isoladas do seu uso, a compreensão dos mecanismos envolvidos na proteção dos animais ainda é limitada. Desta forma, o uso de imunoestimulantes que possuem mecanismos de atuação diferentes não pode ser justificado devido a lacuna no conhecimento do seu modo de ação. Assim, torna-se imprescindível maior esclarecimento destes mecanismos para elucidar seus efeitos na saúde dos peixes de produção.

Além disso, apesar da grande quantidade de trabalhos científicos já publicados, ainda não existe revisão de literatura que aborde a utilização de *S. cerevisiae* na aquicultura. Por isto, o objetivo deste capítulo foi descrever o estado da arte do uso da levedura *S. cerevisiae* e dos componentes derivados da sua célula na criação de peixes, seja como imunoestimulante ou como promotor de crescimento.

## **2. *Saccharomyces cerevisiae***

As leveduras são fungos unicelulares que tem uma ampla distribuição geográfica em reflexo à fácil disseminação pelos animais, correntes de ar e água (Gatesoupe, 2007). Na natureza, são encontradas onde substratos orgânicos estão disponíveis como no solo, folhas, frutos e no trato gastrointestinal de animais, incluindo peixes (Kurtzman, 2010; Navarrete e Tovar-Ramirez, 2014). O gênero *Saccharomyces* constitui o grupo de fungos cujo principal representante é a levedura *S. cerevisiae*, uma espécie cujo tamanho varia entre 5 a 10 microns, cosmopolita, que tem importância como ferramenta biotecnológica na indústria farmacêutica, nos setores voltados à alimentação humana e animal e em processos fermentativos para a produção de bebidas alcoólicas (Moslehi-Jenabian et al., 2010; Goddard e Greig, 2015; Farid et al., 2019).

A utilização de *S. cerevisiae* na produção de alimentos e bebidas fermentativas a tornou conhecida como levedura de panificação ou levedura de cerveja. Para a indústria de alimentos, a levedura é considerada um ingrediente de fácil manipulação em condições laboratoriais, osmotolerante e termotolerante, com baixo custo de aquisição e, devido à sua longa história de aplicação na indústria de produtos alimentícios, é classificada como um organismo GRAS (Generally Recognized as Safe) pelo FDA (Food and Drug Administration) americano, sendo não-patogênico.

A facilidade de manejo em laboratório, aliada as características biológicas, como o ciclo de vida e formas de reprodução fez com que a *S. cerevisiae* se tornasse um microrganismo amplamente estudado em relação à biologia da célula

eucariótica e, conseqüentemente, da biologia humana e animal (Landry et al., 2006; Legras et al., 2007).

O melhoramento genético das estirpes de levedura nos últimos 50 anos decorreu dos avanços de poderosos métodos laboratoriais que permitiram alterar geneticamente sua estrutura molecular. Aliado a isto, foi descoberto que a levedura tem um alto grau de conservação estrutural e funcional entre genes e proteínas de mamíferos e isto incentivou ainda mais pesquisas sobre o tema e o crescimento no número de pesquisadores que a utilizam como modelo experimental (Rine, 1989).

As células de levedura se multiplicam rápido, por divisão, o que ocorre uma vez a cada 90 minutos em condições de laboratório (Bergman, 2016). Sua reprodução pode ser tanto sexuada como assexuada, esta última, envolve dois processos: a mitose e a meiose. A mitose ocorre em condições normais, onde há disponibilidade de nutrientes e origina duas células idênticas e diploides com 32 cromossomos (Hartwell, 1974). Durante a interfase, na fase G1 (*gap 1*) da divisão celular, as células sintetizam proteínas e aumentam seu volume. Se a célula diploide atingir o tamanho ideal e houver disponibilidade de nutrientes, ocorre uma divisão no núcleo, passando pelas fases S (Síntese de DNA), em que fica temporariamente quadriplóide, segue para a fase G2 (*gap 2*) e, por fim, atinge a fase M (*mitose*), gerando uma protuberância ou broto que recebe um dos núcleos gerado pela célula mãe (Rine, 1989; Michels, 2002).

Entretanto, se faltar carbono e nitrogênio ou se a levedura não atingir o tamanho crítico na fase G1 da interfase, haverá uma interrupção da divisão celular e as células deixam o ciclo mitótico e entram em um ciclo meiótico, o que leva à esporulação na fase S (brotamento). A formação de esporos no ciclo de vida de *S. cerevisiae* é uma das diversas respostas adaptativas que o microrganismo utiliza para superar ambientes adversos. Nesta forma, as células podem permanecer estáticas por longos períodos de tempo no ambiente com pouca perda de viabilidade biológica, mantendo suas características estruturais e fisiológicas (Rine, 1989; Michels, 2002).

A germinação do esporo ocorre quando há novamente abundância de nutrientes no meio. Neste caso, o broto cresce progressivamente durante a fase G2 e M. A citocinese ocorre imediatamente no final da fase M ou início da fase G1

(Hartwell, 1974). Este esporo (ascoporo) contém quatro células filhas haploides, ou seja, com metade do material genético original, e cada uma das células no seu interior pode ser do tipo “a” ou tipo “ $\alpha$ ” (Rine, 1989; Bergaman, 2001; Michels, 2002;).

Células adultas do tipo “a” ou tipo “ $\alpha$ ” liberam fatores de acasalamento que são reconhecidos por receptores na membrana de células tipo “ $\alpha$ ” ou tipo “a” (Hartwell, 1974). As células se projetam na mesma direção e inicia-se a reprodução sexuada. Neste tipo de reprodução, as células se fundem e originam uma nova célula diploide “a/ $\alpha$ ” (Rine, 1989). Essas células tem a capacidade de responder à privação de nitrogênio ao se submeter à esporulação por meiose e quando os nutrientes estão novamente disponíveis, os esporos germinam e entram no ciclo mitótico novamente (Rine, 1989; Michels, 2002).

O fato de todos os quatro produtos de uma única meiose serem encontrados no mesmo asco e cada um poder ser separado, crescido em uma colônia e testado por suas propriedades é o aspecto mais importante do ciclo de vida da levedura para os geneticistas (Rine, 1989). Além disso, a existência de tipos de células haplóides e diplóides estáveis significa que o pesquisador pode cultivar um grande número de indivíduos isogênicos e usá-los para a análise do fenótipo por meio de análises citológicas ou bioquímicas (Michels, 2002).

Wang et al., (2017) e Zhou et al., (2018) introduziram genes da  $\beta$ -caroteno hidroxilase (CrtZ) e  $\beta$ -caroteno cetolase (bkt - CrtW) em *S. cerevisiae* e às clonaram para criar cepas super produtoras de astaxantina, um carotenoide altamente valorizado por sua atividade antioxidante. Yan et al., (2015) e Han et al.; (2018) também obtiveram sucesso ao utilizar cepas de *S. cerevisiae* recombinante como transportadoras de DNA em vacina oral para *Carassius auratus*. A mesma técnica foi utilizada por Wi et al., (2015) e Cho et al., (2017) ao produzir uma proteína do capsídeo do vírus RGNNV na levedura e utilizá-la como vacina oral para *Epinephelus septemfasciatus*. Marques et al. (2004) mostraram que a manipulação das características genéticas da *S. cerevisiae* também pode alterar suas qualidades digestivas para artêmias. Soltanian et al., (2007), também selecionaram um conjunto de leveduras isogênicas, com deleção de genes envolvidos na síntese de parede celular e avaliaram suas características nutricionais e imunoestimuladoras

para artemias. Os autores observaram que as leveduras com a parede celular composta por menos mananoproteínas e mais glucana e quitina são facilmente digeridas e protegem de forma mais eficiente a artemia contra o *Vibrio campbellii* quando comparada a outras linhagens de leveduras. Rodriguez et al., (2003) também suplementaram a dieta para a dourada (*Sparus aurata*) com uma linhagem de *S. cerevisiae* (fks-1) obtida por mutagênese, com ausência de  $\beta$ 1,3-D-glucan sintase e alto teor de manoproteínas e quitina. Neste experimento, após quatro semanas de alimentação, a atividade da lisozima foi maior em comparação ao uso de leveduras selvagens. Estes trabalhos demonstram que a criação de cepas de *S. cerevisiae* carreadora de genes específicos podem ajudar a desenvolver estratégias biotecnológicas para a produção de organismos aquáticos.

### 3. Colonização intestinal

Sabe-se que a colonização da mucosa intestinal com uma microbiota benéfica tem um efeito positivo nas funções de regulação imunológica (Balcazar et al., 2006; Lazado et al., 2011) e a perturbação dessas funções por uma microbiota desequilibrada pode contribuir para o desenvolvimento de doenças (Perez-Sanchez et al., 2013). Neste sentido, as leveduras podem estimular o desenvolvimento do intestino ao modular a composição da microbiota dos animais (Giulia et al., 2017; Liu et al., 2018; Zhou et al., 2018) e até mesmo constituir uma parte significativa dos microrganismos entéricos em peixes selvagens e de criação, com diversidade taxonômica e número de colônias variável, podendo em alguns casos, serem mais numerosas do que as bactérias cultiváveis (Andlid, et al., 1995; Gatesoup, 2007).

A colonização da mucosa intestinal é possível graças à interação direta dos carboidratos da parede celular com as células epiteliais e as propriedades adesivas predominantemente conferidas por proteínas específicas da superfície da parede celular dos microrganismos, chamadas de adesinas, que medeiam a interação do microrganismo com os enterócitos do hospedeiro, possibilitando a sua fixação e multiplicação sobre o epitélio (Brückner e Mösch, 2012; Dranginis et al., 2007). As adesinas são fundamentais na consolidação do *quorum sensing* e formação de

biofilmes que impedem a fixação de outros microrganismos no intestino (Nissen, Nielsen e Arneborg, 2002; Bojsen, Andersen e Regenberg, 2012). Caso encontre condições adversas no organismo, a levedura pode manifestar uma série de respostas adaptativas como filamentação, crescimento invasivo e floculação a fim de se estabelecer no ambiente (Zeidan et al., 2013) e uma vez estabelecidas, atuam como substrato alternativo à fixação de enterobactérias e usam uma variedade de mecanismos para competir por inúmeros recursos incluindo nutrientes e oxigênio (Gatesoup, 2007; Perez-Sanchez et al., 2013).

*S. cerevisiae* sintetiza e secreta diferentes enzimas e compostos extracelulares (Tovar-Ramrez et al., 2004) que também auxiliam a adesão ao muco intestinal de peixes (Andlid et al., 1995), protege contra o estresse oxidativo (Folch-Mallol et al., 2004), auxiliam a digestão, absorção da dieta e a maturação do trato digestório (Navarrete e Tovar-Ramírez, 2014; Pongpet et al., 2016).

Além disso, a presença de diferentes proporções de nucleotídeos derivados de ácido nucleicos induz alterações fisiológicas, morfológicas e microbiológicas no trato intestinal (Li e Gatlin, 2006; Guo et al., 2017). Estes nucleotídeos, quando absorvidos pelos enterócitos promovem a síntese de ácidos nucléicos, induzem crescimento dos vilos e o aumento da atividade enzimática que podem resultar no melhor aproveitamento dos alimentos e consequente melhoria no desempenho produtivo (Burrels et al., 2001; Li e Gatlin, 2006; Mydland et al., 2008; Øverland et al., 2013).

#### **4. *S. cerevisiae* na aquicultura**

A grande maioria das espécies de levedura, incluindo *S. cerevisiae*, não é patogênica para os peixes. Embora haja relato de fungemia causada por *S. cerevisiae* var. *boulardii* em animais, incluindo humanos (Lherm et al., 2002; Cassone et al., 2003; Riquelme et al., 2003; Romano et al., 2017), o risco desta e das demais leveduras causarem enfermidades é baixo e parece ser limitado aos peixes imunossuprimidos cultivados em condições inadequadas (Gatesoup, 2007).

#### 4.1. Valor nutritivo e desempenho produtivo

Os produtos à base de *S. cerevisiae* utilizados na alimentação animal são naturais e geralmente provenientes do extrato de processos industriais fermentativos que passam pela secagem por pulverização à seco. Na aquicultura, a levedura é comumente utilizada íntegra, ou processada para separação dos seus derivados imunoestimulantes, como a parede celular,  $\beta$ -glucanas, nucleotídeos e mananoligossacarídeos que comprovadamente influenciam o desempenho produtivo de várias espécies de peixes (Stones e Mills, 2004; Gatesoupe, 2007; Navarrete e Tovar-Ramírez, 2014; Zhou et al., 2018).

A utilização da levedura *S. cerevisiae* na formulação de dietas para organismos aquáticos, ocorre, sobretudo, devido às suas ótimas características nutricionais. Muitas pesquisas foram realizadas com o objetivo de verificar sua função como fonte proteica em dietas para peixes. Entretanto, a composição química e o valor nutritivo específico das células dependem de diversos fatores como, a linhagem, substrato ou meio de cultura utilizado, condições da fermentação, processamento de secagem, método de autólise, armazenamento e idade das células (Carlberg et al., 2015; Vidakovic et al., 2015; Øverland e Skrede, 2017).

De forma geral, a composição química das leveduras apresenta de 38,0 a 64,0% de proteínas, 21,0 a 46,0% de carboidratos, 2,0% a 5% de lipídeos e esteróis, 6,0 a 8,0% de nitrogênio e de 5,0 a 10,0% de minerais como potássio, fósforo, cálcio, magnésio, sódio e enxofre na forma de sulfitos (Pacheco et al., 1997; Caballero-Córdoba, 2000; Yamada e Sgarbieri, 2005; Pardo e Gamboa, 2011; Onofre et al., 2017; Vieira et al., 2016).

O perfil de aminoácidos de *S. cerevisiae* é balanceado e, segundo Vidakov et al., (2015), se assemelha ao perfil da farinha de peixes com alta quantidade de lisina (7,13%), leucina (8,84%), isoleucina (5,64%), treonina (6,16%), triptofano (1,10%), valina (6,20%), Arginina (4%), Histidina (2%), Fenilalanina e Tirosina (9,98%), Metionina e Cisteína, (2,84%) e Histidina (2,06%). Além disso, contém grande quantidade de ácido glutâmico (13%), ácido aspártico (12%) entre outros aminoácidos em concentrações menores (Pacheco et al., 1997). A utilização de levedura como única fonte proteica pode prejudicar o desempenho produtivo devido

a deficiência de aminoácidos sulfurados, principalmente metionina e cisteína, entretanto, esta carência pode ser por suprida com suplementação externa (Yousri., 1982; Oliva-Teles e Gonçalves, 2001; Ozório et al., 2012; Solomon et al., 2017).

Os carboidratos representam de 12 a 38% do peso seco da levedura sendo representado em média por, 28-60% de glucanas, 21% de mananoproteínas, localizados na parede celular, e 12% de glicogênio e 33% de trealose, carboidratos de reserva energética (Chen, 1959; Caballero-Córdoba, 2000; Plata et al., 2013; Vieira et al., 2016; Onofre et al., 2017). Quanto às vitaminas, as leveduras são ricas em vitaminas do complexo B, especialmente em tiamina, riboflavina, niacina e ácido pantotênico que atuam como pró-nutriente aos peixes (Schulz e Oslage, 1976; Yousri, 1982; Vieira et al., 2016). Com relação aos minerais, as leveduras apresentam sódio, magnésio, potássio e cálcio, além de ferro, manganês, zinco, sódio e enxofre na forma de sulfitos (Vieira et al., 2016).

Assim, como a composição nutricional das leveduras é afetada por diversos fatores, os diferentes resultados encontrados na literatura científica quanto ao uso de *S. cerevisiae* em peixes pode ser ocasionado pelas diferenças entre espécies, condições fisiológicas e o tipo de ingredientes utilizados nas dietas basais (Nhi et al., 2018; Rassen et al., 2018).

*S. cerevisiae* é eficiente na melhora do desempenho produtivo e na redução do colesterol plasmático de peixes (Øverland et al., 2013). Mohammad et al., (2014) observaram melhora no fator de condição, taxa de crescimento específico, conversão alimentar aparente e ganho de peso de *Amatitlania nigrofasciata* com 2% de *S. cerevisiae*. Lara-Flores et al., (2003) também observaram altas taxas de crescimento específico e eficiência proteica e menor conversão alimentar aparente em tilápias utilizando *S. cerevisiae* (1,0 g kg<sup>-1</sup>). Li e Gatlin III (2003) suplementaram a dieta do híbrido *striped bass* (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) com 1,0; 2,0 e 4,0% de *S. cerevisiae* e observaram melhora no desempenho produtivo em todas as concentrações testadas.

Barnes et al. (2006) suplementaram dietas de larvas de truta arco-íris com 125 e 250 ppm de levedura e observaram maior ganho de peso, conversão alimentar aparente e sobrevivência dos peixes em relação à dieta não suplementada. Tovar-Ramirez et al., (2004), forneceram para larvas de

*Dicentrarchus labrax* dieta suplementada com levedura viva (1,1%) e observaram menor deformidade das larvas com melhora da sobrevivência e ganho de peso. Meurer et al., (2000), observaram que os alevinos de tilápia-do-Nilo, cuja dieta foi suplementada com 6,0% de *S. cerevisiae* tinham melhor desempenho produtivo em relação ao grupo controle.

Diversos pesquisadores também buscaram avaliar o efeito da substituição da farinha de peixe, um dos ingredientes de maior custo na produção de dietas, por *S. cerevisiae*. Em *D. labrax*, a substituição de 33% da farinha de peixe por levedura melhorou a eficiência alimentar e quando substituído 50% manteve as taxas de crescimento equivalentes (Oliva-Teles e Goncalves, 2001). Ozório et al., (2012) mostraram que substituição de 15% da farinha de peixe por levedura promoveu melhor crescimento e utilização eficiente de nutrientes para *Oreochromis niloticus*. Rumsey et al. (1991) relataram que a alimentação de 25% de levedura de cerveja, substituindo a proteína caseína, melhorou o crescimento e a conversão alimentar de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Da mesma forma, Oliva-Teles e Goncalves (2001) e Zerai et al. (2008), observaram que 50% da farinha de peixe pode ser substituída por levedura de cerveja em dietas para *D. labrax* e *O. niloticus*, respectivamente, sem efeitos adversos no crescimento. Pongpet et al., (2016), mostraram que *S. cerevisiae* pode substituir até 45% da farinha de peixe com um melhor desempenho de crescimento em panga (*Pangasianodon hypophthalmus x Pangasius bocourti*) e, Nhi et al., (2018) obtiveram maior taxa de crescimento específico, eficiência proteica e sobrevivência após substituição de 100% de farinha de peixe por *S. cerevisiae* em sistema de bioflocos quando comparado ao sistema de águas claras. Apesar dos resultados positivos, em outros trabalhos como o de Huyben et al., (2017) não foram observados efeitos na utilização de levedura como fonte proteica.

#### **4.2. Fatores limitantes ao emprego da levedura como alimento**

Como dito anteriormente, as leveduras são capazes de substituir parcialmente os componentes proteicos das dietas (Pongpet et al., 2016). Entretanto, existem restrições quanto ao uso de *S. cerevisiae* como alternativa ao uso de altas quantidades de proteína ou única fonte proteica na nutrição de

organismos aquáticos (Murray e Marchant, 1986; Refstie et al., 2006; Lunger et al., 2006; Ozorio et al., 2010)

Apesar do grau de digestibilidade da parede celular da levedura variar de acordo com o meio de crescimento e o processo de secagem da levedura (Carlberg et al., 2015), de forma geral, a presença de constituintes resistente às enzimas digestivas, tais como a espessa e rígida parede celular, limitam a acessibilidade de todos os conteúdos celulares, incluindo o nitrogênio proteico e não proteico (Murray e Marchant, 1986; Rumsey et al., 1990; Carlberg et al., 2015; Pongpet et al., 2016; Carlberg et al., 2018).

Além da baixa digestibilidade, a parede celular das leveduras contém altos níveis de ácidos nucleicos, principalmente na forma de ácido ribonucléico (RNA) que pode corresponder de 6 a 35% do total de proteínas e 13 a 23% do nitrogênio total celular (Baker e Molitoris, 1974; Schulz e Oslage, 1976). A presença destes ácidos pode estimular tanto a síntese de uricase nos peixes e facilitar sua metabolização (Kinsella et al., 1985) como também pode estimular o aumento da ureogênese devido ao catabolismo das purinas que, por sua vez, refletirá no aumento da excreção de amônia tóxica no ambiente (Oliva-Teles, 2006). Além disso, há vários trabalhos que ressaltam a pouca digestibilidade dos ácidos nucleicos de levedura na nutrição em peixes (Baker e Molitoris, 1974; Kronka et al., 1991; Runsey et al., 1991; Sanches-Muniz et al., 1979; Peres e Oliva-Teles et al., 2003).

Também existem resultados controversos quanto aos benefícios do uso de grandes quantidades de nitrogênio não proteico das leveduras na alimentação de peixes. Quando o nitrogênio é empregado como pró-nutriente, pode melhorar a saúde dos peixes (Furuya et al., 2001; Li e Gatlin III, 2004). Por outro lado, Baccarin e Pezzato, (2001) demonstraram que o teor de nitrogênio não proteico pode ocasionar alterações metabólicas e menor disponibilidade de nutrientes.

Por fim, a baixa palatabilidade dos ácidos pode ser ainda um problema adicional no fornecimento de quantidade elevadas de *S. cerevisiae* para peixes (Murray e Marchant, 1986; Davies e Wareham, 1988; Rumsey et al., 1990; Carlberg et al., 2015). Segundo Hisano (2007), o ácido glutâmico e ácido aspártico presentes na levedura são atrato-palatabilizante nas dietas de peixes. Pereira-Silva e Pezato

(2010) também classificam a levedura como palatável para *O. niloticus*. Entretanto, Ozório et al., (2012), observaram que a substituição acima de 15% da farinha de peixe por levedura tornou a dieta de *O. niloticus* não palatável. Solomon et al., (2017) também observou redução da palatabilidade para *Clarias gariepinus* à medida que o nível de inclusão de *S. cerevisiae* na dieta é aumentado. Rumsey et al., (1991), relataram que a dieta de *O. mykiss* se tornou inconsumível após a substituição de 50% a 75% da farinha de peixe por *S. cerevisiae*. Por fim, Lunger et al., (2006) notaram que a dieta para *Rachycentron canadum* que continha 100% de *S. cerevisiae* em substituição à farinha de peixe não eram consumidas.

Carlberg et al., (2015) ressaltaram que a baixa digestibilidade e palatabilidade da dieta contendo *S. cerevisiae* causou pior desempenho produtivo à *Salvelinus alpinus*. Ozório et al., (2010) também relataram que o crescimento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) foi reduzido quando os peixes foram alimentados com dietas com 70% e 100% de substituição de farinha de peixe por levedura. Vidakovic et al., (2015) observaram que a substituição de 40% da proteína animal da dieta por *S. cerevisiae* não afetou o desempenho produtivo, porém, causou prejuízo à barreira intestinal de *S. alpinus*, resultando em um epitélio mais disperso, o que pode levar ao aumento da translocação de bactérias, vírus, antígenos e outras moléculas. Já Overland et al., (2013), substituíram o mesmo nível de proteína por levedura (40%) para a mesma espécie e não notaram reduções na taxa de crescimento.

### **4.3. *S. cerevisiae* como imunoestimulante**

O uso de *S. cerevisiae* na aquicultura resulta em alterações bioquímicas e hematológicas, com aumento do número de leucócitos e do potencial fagocítico destas células, elevação da concentração de lisozima sérica, da atividade hemolítica do sistema complemento, da expressão de citocinas pró e antiinflamatórias, na redução do cortisol plasmático e na maior sobrevivência dos animais após desafios bacterianos (Abdel-Tawwab et al., 2008; Abu-Elaa et al., 2013; Farid et al., 2019).

A parede celular da levedura é composta por uma camada externa de mananoproteínas, que representa 20-23% do peso da parede celular, e outra camada voltada à face interna da célula composta por fosfolipídios e quitina em menor concentração (Klis, 2006; Li et al., 2016). Estes polissacarídeos estimulam a resposta imunológica no organismo animal (Minami, et al., 2011; Vallejos-Vidal et al., 2016), e atuam como um prebiótico ao estimular seletivamente a fixação e o crescimento de um número limitado de espécies bacterianas no trato intestinal (Gibson e Roberfroid, 1995; Dimitroglou et al., 2009).

Entre as camadas superior e inferior da parede celular, há uma porção intermediária composta por glucanas, macromoléculas formadas por blocos de glicose unidos por meio de ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6 (Klis et al., 2006). O produto comercial a base da molécula de  $\beta$ -glucano isolada é possivelmente o imunestimulante mais utilizado na aquicultura. Este composto é reconhecido diretamente por receptores na superfície de macrófagos que iniciam uma cascata na modulação da resposta imune levando ao aumento do mecanismo de defesa não específico dos peixes (Klis, et al., 2006; Minami et al., 2011), resultando na expressão de genes relacionados à resposta imune logo após o início da suplementação alimentar.

Embora grande parte dos trabalhos com suplementação dietética de levedura atribuam as melhoras no sistema imunológico à presença do  $\beta$ -glucano, este polissacarídeo pode se encontrar preso no interstício interno da parede celular da levedura que apresenta baixa digestibilidade, impedindo ou dificultando sua exposição aos enterócitos intestinais e uma rápida resposta imunológica (Minami, et al., 2011; Vallejos-Vidal et al., 2016). Assim, é provável que a célula de *S. cerevisiae* estimule inicialmente o sistema imunológico animal principalmente pelo reconhecimento das adesinas secretadas pelos microrganismos e pelos mananossacarídeos presentes na parede celular que também têm antígenos reconhecidos pelas células do intestino, como padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) e desencadeiam uma resposta inflamatória leve e não patogênica (Keppler-Ross et al., 2010; Abu-Elaa et al., 2013). Após sua fixação no intestino, as funções prebióticas e probióticas da levedura na eliminação de patógenos e na secreção de compostos extracelulares no intestino conduzem à

melhor integridade intestinal, com aproveitamento de nutrientes e, conseqüente bem-estar animal (Song et al., 2014; Akhter et al., 2015; Dawood et al., 2016). Por isso, a suplementação de *S. cerevisiae* na dieta geralmente exige um tempo maior para observação de melhora na resposta imunológica quando comparado ao fornecimento isolado dos imunossacarídeos presentes em sua composição.

Evidentemente, os efeitos do uso de levedura são dependentes da dose e do tempo de administração, que influenciam sua colonização no intestino. Segundo Ortuño et al., (2002) a suplementação da dieta de *S. aurata* com 1, 3 ou 10 g/kg de levedura mostra os primeiros efeitos nos parâmetros imunes após duas semanas e aumentam após quatro semanas. Neste estudo, a atividade fagocítica dos macrófagos aumentou com a dose mais baixa e altos níveis dietéticos de *S. cerevisiae* não provocaram nenhum efeito no sistema complemento. Abdel-Tawwab et al., (2008) observaram aumento no número de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, proteína, albumina e globulina no sangue e maior sobrevivência de tilápia-do-Nilo alimentadas de 0,1% de levedura na dieta por 12 semanas.

Li e Gatlin (2003), observaram redução na mortalidade do robalo listrado (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) após nove semanas de suplementação dietética com 2% de *S. cerevisiae* e aumento na produção de radicais reativos de oxigênio extracelular e intracelular nos macrófagos renais após 16 semanas de suplementação. Pongpet et al., (2015) substituindo 45% da farinha de peixe por *S. cerevisiae* observaram maior atividade hemolítica do sistema complemento, lisozima e imunoglobulina total após nove meses de criação de panga tailandês (*Pangasius hypophthalmus* x *Pangasius bocourti*). Pooramini et al., (2009) não observaram diferenças na sobrevivência de truta arco-íris alimentadas com 1%, 5% ou 10% levedura por 25 dias. Hoseinifar et al., (2011) também não observaram diferença nos parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de beluga (*Huso huso*) cuja dieta foi suplementada com 2% de *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* por seis semanas.

#### **4.4. Imunomoduladores derivados de *S. cerevisiae*.**

*S. cerevisiae* contém vários compostos imunoestimulantes, como os  $\beta$ -glucanos, mananoproteínas, quitina, ácidos nucleicos e oligossacarídeos (Ferreira et al., 2010; Broadway et al., 2015; Abu-Elala et al., 2018). Entretanto, sua parede celular pouco digerível pode limitar o acesso enzimático ao conteúdo celular (Øverland e Skrede, 2016). Por isto, o processamento, fracionamento e isolamento destes componentes permite elaborar outras categorias de ingredientes específicos com propriedades funcionais diferenciadas para a indústria de alimento humano e animal (Shurson, 2018).

##### **4.4.1. Parede celular de Levedura, $\beta$ -glucano e MOS**

O fornecimento de parede celular de levedura na nutrição animal visa unir os benefícios dos principais imunomossacarídeos presentes em sua composição, principalmente o  $\beta$ -glucano e mananoligossacarídeo (MOS), que atuam no intestino sob diferentes modos de ação (Rodriguez et al., 2003; Refstie et al., 2010; Selin e Reda, 2015; Soares et al., 2018; Abu-Elala et al., 2018).

A inclusão em níveis adequados de  $\beta$ -glucano e MOS na dieta pode promover aumento nos vilos intestinais e número de células caliciformes (Selin e Reda, 2015; Abu-Elala et al., 2018), melhora a resposta antioxidante (Abu-Elala et al., 2018), dos indicadores imunológicos (Selin e Reda, 2015; Abu-Elala et al., 2018;) e de estresse (Soares et al., 2018), além do desempenho produtivo (Selin e Reda, 2015).

Yu et al., (2018), descreveram que 1000-2000 mg/kg da parede celular de levedura melhoraram o desempenho produtivo e o desenvolvimento do muco intestinal do *Lateolabrax japonicus*, enquanto 500 mg/kg aumentaram a resposta imune e a sobrevivência cumulativa após desafio com *Aeromonas veronii*. Abu-Elala et al., (2018) forneceram um produto comercial, Imunowall®, contendo  $\beta$ -glucano e MOS durante dois meses para tilápia-do-Nilo e observaram que a inclusão de 0,2% do aditivo promoveu aumento no crescimento dos animais, bem como no número de leucócitos, proteínas totais e globulinas, nos biomarcadores

antioxidantes (catalase e glutathione-redutase), na resposta imune não específica e na resistência às infecções por *Lactococcus garvieae* e *A. hydrophila*.

Embora sejam relatados outros resultados interessantes com o fornecimento da parede celular de levedura ou do uso combinado de  $\beta$ -glucano e MOS, a sinergia entre estes compostos é pouco mencionada, sendo uma hipótese que carece de mais estudos para comprovação (Refstie et al., 2010; Gu et al., 2011; Soares et al., 2018; Abu-Elala et al., 2018). Além disso, como discutido por Selim e Reda, (2015), e comprovado pelos resultados de Shelby et al., (2009), o uso combinado de  $\beta$ -glucano e MOS na aquicultura pode ter um efeito positivo, efeito negativo ou nenhum efeito sobre o crescimento de peixes. Segundo Dalmo et al., (2008), Sado et al., (2008) e Akrami et al., (2009), a variação destes resultados pode ser devido à diversos fatores como, diferenças no processamento e presença de impurezas no  $\beta$ -glucano, complexidade da estrutura química e origem dos aditivos, o nível de inclusão, o tempo de fornecimento, a espécie, idade, sexo e condições de criação dos peixes.

Os  $\beta$ -Glucanos são um grupo heterogêneo de polissacarídeos que tem a glicose como principal componente estrutural unida por ligações  $\beta$ -glicosídicas (Meena et al., 2012; Mohan et al., 2018). As estruturas dos  $\beta$ -glucanos são diversas e determinam um papel crucial nas atividades biológicas, incluindo a capacidade de reforço imunológico de animais (Ringø et al., 2012; Jin et al., 2018). Por exemplo, o  $\beta$ -glucano da parede celular da *S. cerevisiae* é principalmente constituído uma cadeia de glicose ligada a  $\beta(1\rightarrow3)$  com vários ramos ligados  $(1\rightarrow6)$ , e são sugeridos como sendo os mais potentes estimuladores do sistema imunológico de humanos e animais (Meena et al., 2012; Ringø et al., 2012; Mohan et al., 2018), enquanto que o  $\beta$ -glucano de plantas é constituído principalmente por  $\beta(1\rightarrow3)$  e  $\beta(1\rightarrow4)$  ligado à glicose sem ramificações (Jin et al., 2018; Meena et al., 2012) e geralmente não apresentam funções imunomoduladoras (Ringø et al., 2012).

O  $\beta$ -glucano pertence a uma classe de substâncias conhecidas como modificadores da resposta biológica (MRBs) (Ringø et al., 2012) e seu mecanismo de ação na saúde dos animais está relacionada à sua estrutura reconhecida pelos PAMPs em receptores de reconhecimento padrão (RRP) específicos, como lactosilceramida, *scavenger receptors* (SR), receptores Toll Like (TLRs), em

particular os receptores TLR2 e TLR6, receptores não-TLRs, receptores do sistema complemento CR3 (CD11b/CD18), CR5 e dectina-1 (Dalmo et al., 2008; Józefowski et al., 2012; Meena et al., 2013; Jin et al., 2018).

A dectina-1 presente em monócitos, neutrófilos e macrófagos é, provavelmente, o principal receptor de  $\beta$ -glucano (Herre et al., 2004; Dalmo et al., 2008). Sua interação com TLRs e os demais receptores de superfície celular induz a maturação das células fagocíticas com respostas específicas para produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células fagocíticas e diferenciação de células T, em particular do linfócito Th17 e metabolização do ácido araquidônico para o fortalecimento da imunidade defensiva do hospedeiro (Herre et al., 2004; Dalmo et al., 2008; Meena et al., 2012; Pietretti et al., 2013; Jin et al., 2018).

O tempo de fornecimento, concentrações, espécie e os efeitos benéficos dos  $\beta$ -glucanos em peixes foram extensivamente relatados e comprovam o potencial do imunostimulante para aquicultura (Meena et al., 2012; Vetvicka et al., 2013; Song et al., 2014; Petit e Wiegertjes, 2016; Vallejos-Vidal et al., 2016; Huynh et al., 2017; Mohan et al., 2018; Rojo-Cebreros et al., 2018). De forma geral, os trabalhos recentes confirmam a atuação do  $\beta$ -glucano na melhora do desempenho produtivo nas fases larvais (Ghaedi et al., 2015; Jesus et al., 2018) e juvenis (Aramli et al., 2015; Zhu e Wu, 2018), resposta imune e sobrevivência frente a ação de patógenos (Pilarski et al., 2017; Medina-Gali et al., 2018; Ampham et al., 2019), altera benéficamente o perfil bioquímico (Librán-Pérez et al., 2018; Zeng et al., 2018), melhora a atividade antioxidante (Salah et al., 2017; Lu et al., 2018) e a resposta à estressores (Ji et al., 2017; Montoya et al., 2018).

Os Mananligossacarídeos (MOS) por sua vez, são carboidratos complexos compostos por manose, responsáveis pelo reconhecimento e interações célula-célula, interações com o meio e determinam a especificidade antigênica da levedura. Como prebiótico, o MOS atua como substrato para o crescimento de bactérias comensais específicas, alterando o pH do intestino, induzindo a produção de muco, de ácidos graxos de cadeia curta e de citocinas (Refstie et al., 2010; Akhter et al., 2015; Abu-Elala et al., 2018).

O principal mecanismo de ação do MOS está relacionado à eliminação de patógenos do intestino e consequente melhoria da integridade intestinal. Na estrutura do MOS existem grupos específicos de carboidratos que se assemelham às estruturas das células intestinais (Torrecillas et al., 2014). Estes carboidratos são resistentes ao processo digestivo e contém receptores D-manose que permitem à adesão de fimbrias do tipo 1 presente em bactérias patogênicas (Spring et al., 2000). A fixação do patógeno sobre a manose, promove o bloqueio dos receptores de glicoproteína impedindo sua colonização e fixação no intestino (Hoseinifar et al., 2015). Posteriormente, o MOS e as bactérias são liberados externamente com as fezes (Torrecillas et al., 2014).

Durante o trânsito intestinal, os PAMPs relacionados aos carboidratos, em particular à manose, podem ativar proteínas de sinalização como as Lectinas Ligadoras de Manose (MBL) e outras enzimas primárias que atuam como opsoninas e desencadeiam a cascata do sistema complemento e produção de eicosanóides como fosfolipase A2 (PL2) e ciclooxigenase (COX) resultando numa resposta inflamatória (kuipers et al., 2003; Herre et al., 2004; Van Asbeck et al., 2008; Torrecillas et al., 2014; Selin e Reda, 2015; Abu-Elala et al., 2018).

Assim como ocorre na administração da parede celular de levedura e do  $\beta$ -glucano, a variação de resultados com o uso do MOS pode estar relacionada aos diferentes períodos de aclimação e a condição de criação, espécies selecionadas, diferenças no tamanho e peso e a fonte e concentração de MOS (Gelibolu et al., 2018; Bai et al., 2017).

Gelibolu et al., (2018) não observaram alterações no desempenho produtivo e nos parâmetros hematológicos de *S. aurata* após alimentação com dieta suplementada com MOS mas observaram taxas de sobrevivência maior nos peixes suplementados após desafio com *Yersinia ruckeri*. Forsatkar et al., (2018) descreveram que o MOS tem efeito positivo no crescimento, na maturação gonadal e na redução dos efeitos negativos promovidos pela restrição alimentar. Salze et al., (2008), relatam que O MOS ajudou a regulação osmótica das larvas de còbia (*R. canadum*). Bai et al., (2017) observaram a capacidade do MOS em modular a comunidade de bactérias autóctones intestinais de *Scophthalmus maximus*, segundo os mesmos autores, a suplementação de dietas com MOS também

melhorou a absorção intestinal, o desempenho produtivo e as atividades das enzimas intestinais. Torrecillas et al., (2007) avaliaram a inclusão de MOS em *D. labrax*, por 67 dias com 0%, 2% e 4%. Neste experimento, além da correlação positiva entre os níveis de lisozima e as atividades do sistema complemento no sangue, a inclusão do MOS nas dietas também promoveu o crescimento corporal, mas sem diferenças na avaliação histológica do intestino. Genc et al., (2007), relataram que tilápia-do-Nilo tiveram maiores teores de matéria seca e proteína com o aumento do MOS dietético, enquanto o comprimento médio dos vilos intestinais dos peixes alimentados com 1,5g/kg de MOS foi maior do que os peixes alimentados com 4,5 g/kg. Nenhuma diferença no desempenho produtivo ou índice hepatossomático ou viscerossomático foi observada.

#### 4.4.2. Nucleotídeos

O conteúdo interno das leveduras é rico em nucleotídeos, entretanto, para que se tornem mais biodisponíveis e bioassimiláveis é interessante que se faça a fragmentação ou remoção da sua parede celular (Jarmołowicz et al., 2013). Neste sentido, o extrato de levedura (conteúdo interno das células) ou a levedura hidrolisada (levedura com rompimento da parede celular) são consideradas importantes fonte de aminoácidos e ácidos nucléicos (Ferreira et al., 2010).

Os nucleotídeos são compostos de baixo peso molecular, formados por uma pentose (ribose ou 2'-deoxiribose) que liga um ou mais grupos fosfatos a uma base nitrogenada (púricas ou pirimídicas) (Carver e Walker, 1995; Li e Gatlin III, 2006). Estes compostos têm funções fisiológicas e bioquímicas essenciais na fisiologia de animais que incluem a codificação e o transporte da informação gênica e constituição de ácidos nucléicos, modulação do metabolismo energético, são mediadores fisiológicos do sistema nervoso, atuam como mensageiros celulares secundários e na composição de coenzimas, entre outras funções (Carver e Walker, 1995; Ringø et al., 2012; Shurson, 2018).

Os nucleotídeos estão naturalmente presentes em todos os alimentos de origem animal e vegetal como nucleotídeos livres e ácidos nucléicos (Li e Gatlin III, 2006). No corpo dos animais, os nucleotídeos são sintetizados (nucleotídeos

endógenos) pelos órgãos, como o fígado (Burrells et al., 2001 A). Além disso, as dietas utilizadas na aquicultura utilizam fontes exógenas de nucleotídeos, que são suficientes para atender as exigências normais para manutenção da saúde e crescimento dos peixes. No entanto, os eventos estressantes associados à manejo na aquicultura como biometrias, transporte, vacinação, doença, etc., podem levar ao aumento da dependência de oferta exógena dos nucleotídeos para manter as funções fisiológicas normais como crescimento e resistência à doenças (Burrells et al., 2001 A; Ringø et al., 2012).

As pesquisas referentes à utilização de nucleotídeos na alimentação de organismos aquáticos se iniciaram na década de 70 com estudos sobre palatabilidade em *Homarus gammarus* (Mackie, 1973), *Fugu pardalis* (Kiyohara et al., 1975) e *S. maximus* (Mackie e Adron, 1978). Atualmente, os estudos sobre o fornecimento de nucleotídeos na dieta para peixes mostram resultados benéficos bastante consistentes (Li e Gatlin III, 2006; Ringø et al., 2012; Guo et al., 2017). No entanto, estes efeitos variam em diferentes espécies de peixes e dependem do período de alimentação, fases da vida dos peixes e do tipo de nucleotídeos suplementados nas dietas (Li & Gatlin 2006).

Existem fortes indícios de que a suplementação dietética com nucleotídeos atua sobre o trato intestinal, particularmente nas funções fisiológicas, no perfil morfológico e na comunidade microbiológica (Burrells et al., 2001 B; Li e Gatlin III, 2006). Após ingerido, o grupo fosfato dos nucleotídeos são suprimidos, principalmente por fosfatases alcalinas intestinais e reduzidos para nucleosídeos que por sua vez, são clivados para produzir bases livres de purina e pirimidina até que sejam absorvidos pela mucosa intestinal (Li e Gatlin III, 2006).

Os benefícios da sua utilização incluem a melhora do desempenho produtivo (Burrells et al., 2001 B; Meng et al., 2017; Guo et al., 2017), e da qualidade das larvas através da fortificação dos reprodutores (Ringø et al., 2012) e com envolvimento na palatabilidade do alimento (Li e Gatlin III, 2006; Ringø et al., 2012), a capacidade anti-estresse (Burrells et al., 2001A), as respostas imunológicas (Ringø et al., 2012; Shiau et al., 2015), bem como a melhora na eficácia da vacinação e da capacidade antioxidante (Burrells et al., 2001B; Xu et al., 2015; Meng et al., 2016). Guo et al., (2017), relataram que a melhora no desempenho

produtivo do zebra-fish alimentados com uma dieta com 0,1% de nucleotídeos pode ser devido ao acúmulo de energia e redução do gasto energético. Shiau et al., (2015), relataram maior sobrevivência de tilápias após desafio com *Streptococcus iniae*. Além disso, a taxa de proliferação de linfócitos, a produção de O<sub>2</sub> no rim cefálico e a atividade da lisozima no plasma foram aumentadas após suplementação da dieta com 240 mg/kg de nucleotídeos. A suplementação com 0,6 a 0,8% de nucleotídeos na dieta também melhorou o crescimento, a utilização do alimento, a morfometria intestinal, o estado antioxidante e a resposta imune inespecífica da tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*) (Xu et al., 2015). Meng et al., (2016) relataram que a inclusão de 0,3 g/kg de nucleotídeos na dieta melhorou o desempenho produtivo, capacidade antioxidativa e morfologia intestinal de *S. maximus*. Entretanto, os autores descreveram um possível aumento do estresse oxidativo, danos morfológicos no intestino e redução do crescimento após utilização de 1,5 g/kg de nucleotídeos na dieta.

Jarmołowicz et al., (2017) observaram que a administração de extrato de levedura na dieta do *Sander lucioperca* por 60 dias promoveu aumento do peso corporal com redução da atividade da alanina aminotransferase (ALT) e maior altura dos enterócitos à medida que a quantidade de extrato de levedura adicionada às dietas aumentou. Hassan et al., (2018) também testaram o uso do extrato de levedura na dieta de tilápia-do-Nilo e após 84 dias de suplementação dietética notaram que o fornecimento de 15 g/kg de extrato de levedura resultou em diferenças na composição centesimal e no perfil hematológico, além de aumento na albumina e globulina dos peixes enquanto os níveis de colesterol e triglicérides, ALT e aspartato aminotransferase (AST) diminuíram. Por fim, Zhou et al., (2018) estudaram o efeito do hidrolisado de levedura na dieta de *Micropterus salmoides* administrada durante oito semanas e observaram que a adição de 0,2% do hidrolisado reduziu a gordura intraperitoneal e modulou a comunidade bacteriana intestinal com possível redução de potenciais patógenos.

#### **4.4.3. Levedura selenizada**

Devido ao acelerado metabolismo, as leveduras têm alto nível de interação com o ambiente extracelular, removendo substâncias orgânicas, minerais e metais

do meio e as assimilando em sua estrutura celular (Kieliszek et al., 2015). A eficiente incorporação e conversão dos muitos compostos do ambiente dão um importante papel na biorremediação de ambientes poluídos (Pérez-Corona, 1997) e no bioenriquecimento de alimentos para fornecimento animal (Brady et al., 1994; Wang e Chen, 2006). Muitos oligoelementos podem ser utilizados no enriquecimento de leveduras, entretanto, o selênio (Se) apresenta ótimas vantagens para uso na aquicultura, por ser um elemento traço essencial que desempenha funções biológicas importantes para manutenção da saúde dos animais (Schwarz e Foltz, 1957; Khan et al., 2017; Kumar e Singh, 2019).

O Se isolado e identificado em 1817 está presente nos seres vivos, no solo e nas águas de rios e oceanos. Na natureza, a forma inorgânica do selênio é encontrada em quatro estados de oxidação: selênio elementar ( $\text{Se}^0$ ), Se (II) (Seleneto,  $\text{Se}^{2-}$ ), Se (IV) (selenito,  $\text{SeO}_3^{2-}$ ) e Se (VI) (selenato,  $\text{SeO}_4^{2-}$ ) (Pérez-Corona, 1997; Kitajima e Chiba, 2013; Khakpour et al., 2014).

A levedura acumula Se naturalmente e o converte em estruturas celulares a partir de processos físico-químicos complexos ainda não totalmente compreendidos (Kieliszek et al., 2015). Acredita-se que a incorporação do Se ocorra em duas etapas, a primeira, compreende o processo passivo, no qual ocorre a adsorção do Se à parede celular da levedura a partir da ligação iônicas ou complexação de íons selênio (quimissorção) (Kieliszek et al., 2015). Neste processo, o Se é aderido aos biopolímeros da parede celular da levedura tais como grupos de proteínas, fosfolipídios ou polissacarídeos, com especial participação das mananas que regulam a permeabilidade da parede celular (Kieliszek et al., 2015).

Assim que o Se atinge a membrana plasmática, se inicia a segunda fase de absorção através do transporte ativo (Kieliszek et al., 2015) e passivo (Kitajima e Chiba, 2013) até o interior da célula. Aparentemente, as vias de transporte para o selênio até o interior das células são dependentes da presença de glicose e são influenciadas pelo estado de oxidação do elemento e características físico-químicas do meio, como temperatura, pH e acidez (Pérez-Corona, 1997; Kieliszek et al., 2015). Nestas vias de transporte, o Se compete com diversos metais como enxofre, fosfatos e sulfatos por sítios de ligação (Kitajima e Chiba, 2013; Kieliszek

et al., 2015). Após absorvido, o Se (IV) é convertido através de uma série de reações enzimáticas à seleneto (II) e em seguida à seleneto de hidrogênio (H<sub>2</sub>Se) (Kieliszek et al., 2015). O H<sub>2</sub>Se resultante, juntamente com o Se (VI) são ligados à O-acetilhomoserina e com auxílio da homocisteína síntase são transformados em seleno-homocisteína que podem ser convertidos em selenometionina (SeMet) (Schrauzer, 2000; Kitajima e Chiba, 2013; Kieliszek et al., 2015). A SeMet por sua vez, pode ser transformada em selenocisteína (SeCis) através da enzima cistationina  $\gamma$ -liase. A SeMet pode constituir até 90% do conteúdo total de selênio em células de levedura, entretanto, uma grande variedade de compostos pode ser formada além da SeCis, como selenociteterina, Se-metilselenocisteína e  $\gamma$ -glutamil-Se-metilselenocisteína (Schrauzer, 2000).

A SeMet e a SeCis são consideradas formas orgânicas do Se e possuem estrutura semelhante aos aminoácidos metionina e a cisteína respectivamente, se diferenciando apenas pela presença do Se no lugar do enxofre (S). Devido à semelhança estrutural, a SeMet e SeCis entram na via metabólica do S, onde são convertidos em análogos de S (Kitajima e Chiba, 2013) e podem substituir a metionina e a cisteína durante a síntese proteica, tornando o Se mais biodisponível, facilitando sua absorção no trato gastrointestinal e a incorporação nos tecidos dos animais (Schrauzer, 2000; Tapiero et al., 2003; Rayman, 2008).

O Se na forma de SeMet executa suas principais funções biológicas nos animais quando integra as selenoproteínas (Holben e Smith 1999; Schrauzer, 2000). A quantidade de selenoproteínas é variável entre espécies animais. Atualmente, os humanos têm cadastradas 25 selenoproteínas, a maior parte dos vertebrados exibem cerca de 28 genes de selenoproteínas e os peixes teleósteos, em função da pressão evolutiva, apresentam em torno de 40 selenoproteínas (Mariotti et al., 2012; Sarangi et al., 2018). Além disso, os peixes têm selenoproteínas maiores e potencialmente mais transportadores de Se via plasma do que a maioria dos outros vertebrados (Sarangi et al., 2018).

Embora a maioria das funções das selenoproteínas em peixes sejam desconhecidas, sabe-se que elas desempenham papéis importantes em vários processos fisiológicos, principalmente no controle, ação e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) como O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hidroperóxidos, lipoperóxidos e

fosfolípidos hidroperóxidos que causam danos irreversíveis à membrana das células (Papp et al., 2007; Förstermann e Sessa, 2012; Klebanoff et al., 2013). Além disso, as selenoenzimas tem função importante na formação dos espermatozóides, síntese de RNA, síntese de prostaglandinas e metabolismo de ácidos graxos.

Algumas selenoproteínas como a Glutathione peroxidase (GSHPx) e a Desiodinase, regulam a conversão do hormônio tireoidiano inativo (tiroxina, T4) em um hormônio tireoidiano metabolicamente ativo (3,5,3'-triiodotironina, T3). A concentração sérica elevada de T3 aumenta os níveis de RNA mensageiro do hormônio do crescimento (GH) nas células hipofisárias e promove a síntese do GH em peixes, aumentando assim seu crescimento (Kohrle e Gartner, 2009; Khan et al., 2016, Khan et al., 2017; Guo et al., 2018; Kumar e Singh; 2019).

Se por um lado, o Se quando fornecido em concentrações ideais é micronutriente necessário para manutenção das funções fisiológicas normais do organismo, por outro lado, também é altamente tóxico e prejudicial quando fornecido de forma desbalanceada (Schrauzer, 2000; Hamilton, 2004). A ingestão de dietas deficientes em Se promovem transtornos metabólicos, alterações hematológicas, distrofia muscular e redução na taxa de crescimento, anemia, hemorragia, acúmulo de líquido na cavidade peritoneal e no pericárdio, redução da síntese e dos níveis de selenoproteínas incluindo a GSHPx plasmática e hepática e podem resultar em doenças, principalmente devido a peroxidação lipídica e do aumento do estresse oxidativo resultando em mortalidade (Haslett et al., 1997; Hamilton, 2004; Khan et al., 2016; Khan et al., 2017).

Em excesso, o Se substitui erroneamente o enxofre durante a síntese protéica e impede que ocorram ligações de dissulfeto iônico (S-S) (Lemly 2002; Zheng et al., 2018), gerando enzimas e proteínas não funcionais e prejudicando processos bioquímicos normais, causando toxicidade, diminuição das funções cognitivas e resultando em edemas, degeneração do folículo ovariano e do fígado, aparecimento de aberrações cromossômicas, complicações no músculo cardíaco, redução nos níveis de hematócrito, hemoglobina, no crescimento, desempenho produtivo e também resultando em mortalidade (Rodríguez e Rojas 2014; Sharma et al., 2017; Khan et al., 2017; Gobi et al., 2018; Sele et al., 2018).

Por serem mais biodisponíveis, o Se nas formas orgânicas SeMet e SeCis acumula-se no tecido muscular, fígado e brânquias dos peixes em um nível diretamente proporcional à ingestão dietética (Lin e Shiau, 2005; Lee et al., 2016), e em quantidades superiores às formas inorgânicas (Küçükbay et al., 2009; Rider et al., 2009). Vários estudos mostram a menor toxicidade ou melhor eficiência das formas orgânicas do Se em relação às inorgânicas no cultivo de peixes. Lee et al., (2016), utilizando a SeMet como fonte de selênio, descreveram que a exigência para tilápia-do-Nilo está entre 1 e 2mg/kg de dieta. Os mesmos autores consideraram que a suplementação dietética entre 6 a 15mg/kg é tóxica e promove a redução de crescimento, prejuízos na resposta imunológica e mortalidade dos peixes. Já Atencio et al., (2009) utilizando selenito de sódio, observaram proteção contra o estresse oxidativo na tilápia-do-Nilo quando estas receberam dieta suplementada com 1,5 a 6mg/kg.

Lin (2014), utilizou a mesma quantidade de SeMet e selenito de sódio (inorgânico) e observou maior retenção de Se do músculo dos peixes alimentados com SeMet, confirmando a maior biodisponibilidade da forma orgânica. Küçükbay et al., (2009) também relataram que o acúmulo de Se no músculo, a atividade GSH-Px e a expressão de gene Hsp70 relacionados à proteção contra o estresse em *O. mykiss* foi notavelmente maior no grupo que recebeu SeMet como suplementação dietética em comparação ao grupo que recebeu selenito de sódio e o controle.

Uma vez que a levedura enriquecida com selênio (levedura-selenizada) é fonte de selênio orgânico, sua utilização também promove maior incorporação de Se nos tecidos quando comparado ao uso de fontes inorgânicas de selênio. A suplementação dietética de levedura-selenizada por 10 semanas aumentou significativamente o crescimento de *O. mykiss* (Wang et al., 2018). Durante o estresse, a utilização do Se nos tecidos foi mais eficaz com uso da levedura selenizada do que com o selenito de sódio (Rider et al., 2009). Após 60 dias de alimentação de *Megalobrama amblycephala* com levedura selenizada, os parâmetros de crescimento, os níveis séricos de GH, IGF-1 e IGF-2, foram maiores que o controle (Guo et al., 2018). Mansour et al., (2017) também descreveram os benefícios da utilização de levedura selenizada na criação de *Argyrosomus regius*.

Segundo os autores, a suplementação dietética por 63 dias melhorou o desempenho produtivo e os parâmetros imunológicos e hematológicos (imunoglobulina, lisozima, mieloperoxidase, atividade hemolítica do sistema complemento e explosão respiratória de leucócito). Khalil, et al., (2018) descreveram melhor desempenho do produtivo, maior sobrevivência e acúmulo de Se no músculo e da área de absorção intestinal conforme aumento da quantidade de levedura selenizada fornecida à dieta de larvas de *A. regius*. Após 60 dias de suplementação dietética com levedura selenizada para *M. amblycephala*, Long et al., (2017) também descreveram melhor resultado no desempenho produtivo e na capacidade antioxidante em comparação ao grupo controle.

## 5. Conclusão

A levedura e seus componentes celulares melhoram o aproveitamento de alimentos e estimulam o sistema imunológico dos peixes, atuando como alternativa segura à utilização de químicos e antimicrobianos na aquicultura. Os benefícios da utilização destes compostos em condições de pesquisa já estão consolidados, embora os mecanismos utilizados para a promoção destes efeitos, como a interação imunoestimulante-organismo, ainda são pouco conhecidos. A falta de padronização na metodologia utilizada, assim como, variações nas condições de produção e processamento dos imunoestimulantes dificultam a comparação dos dados para as mesmas espécies de peixes. Isto prejudica a objetividade na busca por respostas quanto ao benefício dos aditivos. Além disso, neste momento, se faz necessário realizar estudos com o uso de imunoestimulantes em produções comerciais, onde há interação com os fatores bióticos e abióticos dos sistemas de produção. Finalmente, este artigo propõe testes com uso combinado de diferentes suplementos dietético naturais, que atuem de forma diferente no organismo animal para que possam ser usados no controle estratégico de doenças por períodos mais longos na aquicultura, sem a problemática do acúmulo de resíduos no peixe ou no ambiente.

## 6. Referências Bibliográficas

Abdel-Tawwab, M.; Abdel-Rahman, A. M.; Ismael, N. E. M., Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**, v.280, n.1-4, p.185–189, 2008.

Abu-Elala, N. M.; Younis, N. A.; AbuBakr, H. O.; Ragaa, N. M.; Borges, L. L.; Bonato, M. A., Efficacy of dietary yeast cell wall supplementation on the nutrition and immune response of Nile tilapia. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**. v.4, n.4, p.333-341, 2018.

Abu-Elala, N. M.; Marzouk, M.; Moustafa, M., Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1, n.1, p.21-29, 2013.

Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A. M.; Mohsin, M., Probiotics and prebiotics associated with **Aquaculture**: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.2, p.733–741, 2015.

Akter, M. N.; Sutriana, A.; Talpur, A. D.; Hashim, R., Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture International**, v.24, n.1, p.127-144, 2016.

Andlid, T.; Juárez, R. V.; Gustafsson, L., Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). **Microbial Ecology**, v.30, p.321–334, 1995.

Aramli, M. S.; Kamangar, B.; Nazari, R. M., Effects of dietary  $\beta$ -glucan on the growth and innate immune response of juvenile persian sturgeon, *Acipenser persicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.47, n.1, p.606–610, 2015.

Atencio, L.; Moreno, I.; Jos, Á.; Prieto, A. I.; Moyano, R.; Blanco, A.; Cameán, A. M., Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Toxicon**, v.53, n.2, p.269–282, 2009.

Ayandiran, T. A.; Ayandele, A. A.; Dahunsi, S. O.; Ajala, O. O., Microbial assessment and prevalence of antibiotic resistance in polluted Oluwa River, Nigeria. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**. v.40, n.3, p.291-299, 2014.

Baccarin, A. E.; Pezzato, L. E., Efeito da levedura desidratada de álcool em dietas para tilapia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.549-556, 2001.

Bagni, M.; Romano, N.; Finoia, M. G.; Abelli, L.; Scapigliati, G.; Tiscar, P. G., Short and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.18, n.4, p.311-25, 2005.

Bahi, A.; Guardiola, F. A.; Messina, C.; Mahdhi, A.; Cerezuela, R.; Santulli, A.; Esteban, M. A., Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response and gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.60, p.50–58, 2017.

Bai, N.; Gu, M.; Xu, X.; Xu, B.; Krogdahl, Å., Protective effects of mannan oligosaccharides on turbot *Scophthalmus maximus* suffering from soy enteropathy. **Aquaculture**, v.476, p.141–151, 2017.

Baker, D. H.; Molitoris, B. A., Utilization of nitrogen from selected purines and pyrimidines and from urea by the young chick. **Journal of Nutrition**, v.104, p.553-557, 1974.

Balcazar J. L.; de Blas, I.; Ruiz-Zarzuola, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Muzquiz, J. L., The role of probiotics in Aquaculture. **Veterinary Microbiology**. v.114, n.3-4, p173-186, 2006.

Barman, D.; Nen, P.; Mandal, S.C.; Kumar, V., Immunostimulants for Aquaculture Health Management. **Journal of Marine Science: Research & Development**. v.134, n.3, 2013.

Barnes, M. E.; Durben, D. J.; Reeves, S. G.; Sanders, R., Dietary yeast culture supplementation improves initial rearing of McConaughy strain rainbow trout. **Aquaculture Nutrition**. v.12, n.5, p.388–394. 2006.

Ben-Hamed, S.; Ranzani-Paiva, M. J.; Tachibana, L.; Dias, D. C.; Ishikawa, Estaban, M. A., Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. **Fish & Shellfish Immunology**. v.80, p.550–562, 2018.

Bergman, R. D.; Kaestner, D.; Taylor, A. M., Life cycle impacts of north american wood panel manufacturing. **Wood and Fiber Science**. v.48, p. 40-53, 2016

Bojsen, R. K.; Andersen, K. S.; Regenber B., *Saccharomyces cerevisiae* – a model to uncover molecular mechanisms for yeast biofilm biology. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.65, n.2, p.1–14, 2012.

Brooks, B. W.; Conkle, J. L., Commentary: Perspectives on **Aquaculture**, urbanization and water quality. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. v.217, p.1-4, 2019.

Brückner, S.; Mösch, H.-U., Choosing the right lifestyle: adhesion and development in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v.36, n.1, p.25-28, 2012.

Burrells, C.; Williams, P. D.; Forno, P. F., Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 1. Effects on resistance to disease in salmonids. **Aquaculture**. v.199, p.159–169, 2001A.

Burrells, C.; Williams, P. D.; Southgate, P. J.; Wadsworth, S. L.; Dietary nucleotides: a novel supplement in fish feeds. 2. Effects of vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L). **Aquaculture**. v. 199, p.171–184, 2001B.

Bush, S. R.; Oosterveer P., **Governing Sustainable Seafood**. Routledge: London. 208p. 2019.

Bush, S. R.; Belton, B.; Little, D. C.; Islam, MD. S., Emerging trends in **Aquaculture** value chain research. **Aquaculture**, v.498, p.428-434, 2018.

Carbone, D.; Faggio, C., Importance of prebiotics in **Aquaculture** as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 54, p. 172-178, 2016.

Carlberg, H.; Cheng, K.; Lundh, T.; Brännäs, E., Using self-selection to evaluate the acceptance of a new diet formulation by farmed fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v.171, p.226–232, 2015.

Carlberg, H.; Lundh, T.; Cheng, K.; Pickova, J.; Langton, M.; Gutiérrez, J. L.V.; kiessling, A.; Brännäs, E., In search for protein sources: Evaluating an alternative to the traditional fish feed for Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). **Aquaculture**, v.486, p.253–260, 2018.

Carver, J. D., Walker, W. A., The role of nucleotides in human nutrition. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.6, p.58–72, 1995.

Cassone, M.; Serra, P.; Mondello, F.; Girolamo, A.; Scafetti, S.; Pistella, E.; Venditti, M., Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* subtype *boulardii* fungemia in patients neighboring those treated with a probiotic preparation of the organism. **Journal of clinical microbiology**, v.41, n.11, p.5340–5243, 2003.

Castro-Escarpulli, G.; Figueras, M. J.; Aguilera-Arreola, G.; Soler, L.; Fernandez-Rendon, E.; Aparicio, G.O.; Guarro, J.; Chacon, M. R., Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**. v. 84, p. 41–49, 2003.

Chen, S. L., Carbohydrate assimilation in actively growing yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.32, p.470-480, 1959.

Cho, S. Y.; Kim, H. J.; Lan, N. T.; Han, H.-J.; Lee, D.-C.; Hwang, J. Y.; Kim, H.-J., Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-

spotted grouper nervous necrosis virus. **Veterinary Microbiology**, v.204, p.159–164, 2017.

Brady, D.; Stoll, A.; Duncan, J.R, Biosorption of heavy metal cations by non-viable yeast biomass. **Environmental Technology**. v.15, p.429-438, 1994.

Dalmo, R. A.; Bogwald, J., Beta-glucans as conductors of immune symphonies. **Fish & Shellfish Immunology**. v.25, n.4; p.384–396, 2008.

Das, S.; Mondal, K.; Haque. S., A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of Aquaculture. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.5, n.2, p.422-429. 2017.

Davies, S. J.; Wareham, H., A preliminary evaluation of an industrial single cell protein in practical diets for Tilapia (*Oreochromis moçambicus*, Peters). **Aquaculture**, v.73, n.1-4, p.189-99, 1988.

Dawood, M. A. O.; Koshio, S.; Esteban, M. Á., Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in Aquaculture: a review. **Reviews in Aquaculture**, v.10, n.4, p.950-974, 2017.

Dawood, M. A. O.; e Koshio, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp Aquaculture: A review. **Aquaculture**, v.454, p.243–251, 2016.

Deivasigamani, B.; Subramanian, V.; Applications of Immunostimulants in Aquaculture: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied**, v.5, n.9, p.447-453, 2016.

Dimitroglou, A.; Merrifield, D. L.; Spring, P.; Sweetman, J.; Moate, R.; Davies, S. J., Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.300, n.1-4, p.182–188, 2010.

Dimitroglou, A.; Merrifield, D. L.; Moate, R.; Davies, S. J.; Spring, P.; Sweetman, J., Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), **Journal of Animal Science**. v. 87, n. 10, p. 3226–3234, 2009.

Dranginis, A. M.; Rauceo, J. M.; Coronado, J. E.; Lipke, P. N., A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.71, n.2, p.282–294, 2007

FAO, Food and Aquiculture Organization of the United Nations. FISH TO 2030. **Prospects for Fisheries and Aquaculture. Agriculture and Environmental services discussion**: Paper 03. International Bank for Reconstruction and Development / International Development Association or The World Bank. 2013.

FAO, Food and Aquiculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**, Rome. 2018.

Farid, F.; Sideeq, O.; Khan, F.; Niaz, K., Chapter 5.1: *Saccharomyces cerevisiae*. In.: Nabavi, S.; Silva, A., **From yeast and fungi: Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**, p.501–508, 2019.

Ferreira, I.; Pinho, O.; Vieira, E.; Tavares, J., Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: Characteristics and potential applications. **Trends in Food Science and Technology**, v.21, n.2, p.77–84, 2010.

Folch-Mallol, J. L.; Garay-Arroyo, A.; Lledías, F.; Robles, A. A. C., La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, v.46, n.1-2, p.24-46. 2004.

Forsatkar, M. N.; Nematollahi, M. A.; Rafiee, G.; Farahmand, H.; Lawrence, C., Effects of the prebiotic mannan-oligosaccharide on feed deprived zebrafish: Growth and reproduction. **Aquaculture Research**, v.49, n.8, p.2822–2832, 2018.

Förstermann, U.; Sessa, W.C., Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **European Heart Journal**, v.33, p. 829-837, 2012.

Furuya, W. M., **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010.

Furuya, W. M.; Pezzato, L. E.; Pezzato, A. C.; Barros, M. M., Coeficientes de digestibilidade e valores de aminoácidos digestíveis de alguns ingredientes para

Tilapia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.4, p.1143-1149, 2001.

Caballero-Córdoba, G. M.; Sgarbieri, V. C., Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and a yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.3, p. 341-351, 2000.

Ganner, A.; Schatzmayr, G.; Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, n.2, p.289-297, 2012.

Garcia, F.; Moraes, F. R., Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p.17-21, 2009.

Gatesoupe, F. J., Live yeasts in the gut: Natural occurrence, dietary introduction, and their effects on fish health and development. **Aquaculture**, v.267, p.20-30, 2007.

Gelibolu, S.; Yanar, Y.; Genc, M. A.; Genc, E., The effect of mannan-oligosaccharide (MOS) as a feed supplement on growth and some blood parameters of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.18, p. 817-823, 2018.

Genc, M. A.; Yilmaz, E.; Genc, E.; Aktas, M., Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*). **Israeli Journal of Aquaculture**, v.59, p.10–16, 2017.

Ghaedi, G.; Keyvanshokoo, S.; Mohammadi Azarm, H.; Akhlaghi, M., Effects of dietary  $\beta$ -glucan on maternal immunity and fry quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.441, p.78–83, 2015.

Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B., Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v.125, n.6, p.401–1412, 1995.

Giri, S. S., Chi, C.; Jun, J. W., Park, S. C., Use of bacterial subcellular components as immunostimulants in fish Aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v.10, n.2, 2016.

Giulia, M.; Caccamo, L.; Mancuso, M.; Cusimano, G. M.; Gai, F.; Genovese, M.; Ghonimy, A.; Genovese, L., *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* preserves the integrity of intestinal mucosa in gilthead seabream, *Sparus aurata* subjected to a bacterial challenge with *Vibrio anguillarum*. **Aquaculture Research**, v.48, n.2, p. 725-728, 2015.

Gobi, N.; Vaseeharan, B.; Rekha, R.; Vijayakumar, S.; Faggio, C., Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.162, p.147–159, 2018.

Goddard, M. R.; Greig, D., *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? **FEMS Yeast Research**, v.15, n.3, 2015.

Gu, M.; Ma, H.; Mai, K.; Zhang, W.; Bai, N.; Wang, X., Effects of dietary  $\beta$ -glucan mannan oligosaccharide and their combinations on growth performance, immunity and resistance against *Vibrio splendidus* of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.31, n.2, p.303-309, 2011.

Guo, H.; Lin, W.; Hou, J.; Wang, L.; Zhang, D.; Xu, W.; Li, L.; Li, D., The Protective Roles of Dietary Selenium Yeast and Tea Polyphenols on Growth Performance and Ammonia Tolerance of Juvenile Wuchang Bream (*Megalobrama amblycephala*). **Frontiers in Physiology**, 9; 1317, 2018.

Guo, X.; Ran, C.; Zhang, Z.; He, S.; Jin, M.; Zhou, Z., The Growth-Promoting Effect of Dietary Nucleotides in Fish Is Associated with an Intestinal Microbiota-Mediated Reduction in Energy Expenditure. **The Journal of Nutrition**, v.147, n.5, p.781–788, 2017.

Hamilton, S. J., Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. **Science of the Total Environment**, v.326, n.1–3, p.1-31, 2004.

Han, B.; Xu, K.; Liu, Z.; Ge, W.; Shao, S.; Li, P.; Zhang, Z., Oral yeast-based DNA vaccine confers effective protection from *Aeromonas hydrophila* infection on *Carassius auratus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.84, p.948-954, 2018.

Hartwell, L. H., *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. **Bacteriological Reviews**, v. 38, n.2, p.164-198, 1974.

Haslett, C., Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British Medical Bulletin**, v.53, n.3, p. 669-683, 1997.

Hassan, M. S.; Soltan, M. A.; Ghonemy, M. M. R., Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian Journal of Aquatic Research**, n, 40, n. 2, p. 199-208, 2014.

Hassen, Y.; Mukisa, I. M.; Kurabachew, H.; Desalegn, B. B., Evaluation of Yeast and Lactic Acid Bacteria Starter Cultures for the Production of Rice Injera. **Journal of Food Processing & Technology**, v.9, n.3, 2018.

Herre, J., Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophages. **Molecular Immunology**, v. 40, n.12, p.869–876, 2004.

Hisano, H.; Narváez-Solarte, W. V.; Barros, M. M.; Pezzato, L. E., Desempenho produtivo de alevinos de tilápia-do-nilo alimentados com levedura e derivados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, n.7, p.1035-1042. 2007.

Holben, D.; Smith, A. M., The Diverse Role of Selenium within Selenoproteins. **Journal of the Academic of Nutrition and Dietetics**, v.99, n.7, p.836–843, 1999.

Hoseinifar, S.H.; Sun, Y-Z.; Wang, A.; Zhou, Z., Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. **Frontiers in Microbiology**. v.9, p. 2429, 2018.

Huyben, D.; Nyman, A.; Vidaković, A.; Passoth, V.; Moccia, R.; Kiessling, A.; Dicksved, Lundh, T., Effects of dietary inclusion of the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus* on gut microbiota of rainbow trout. **Aquaculture**, v.473, p.528–537, 2017.

Huynh, T.-G.; Shiu, Y.-L.; Nguyen, T.-P.; Truong, Q.-P.; Chen, J.-C.; Liu, C.-H., Current applications, selection, and possible mechanisms of actions of synbiotics in improving the growth and health status in **Aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology**, v.64, p.367–382, 2017.

Jahangiri, L.; Esteban, M. A., Administration of Probiotics in the Water in Finfish **Aquaculture** Systems: A Review. *Fishes*. v.3, n.33, 2018.

Jarmołowicz, S.; Rożyński, M.; Kowalska, A.; Zakęś, Z., Growth in juvenile pikeperch (*Sander lucioperca* L.) stimulated with yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, extract. **Aquaculture Research**, v.49, n.2, p.614–620. 2017.

Ji, L.; Sun, G.; Li, J.; Wang, Y.; Du, Y.; Li, X.; Liu, Y., Effect of dietary  $\beta$ -glucan on growth, survival and regulation of immune processes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.64, p.56–67. 2017.

Jin, Y.; Li, P.; Wang, F.,  $\beta$ -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvant activity, structure-activity relationship and receptor recognition properties. **Vaccine**, v.36, n.35, p.5235–5244, 2018.

Józefowski, S.; Yang, Z.; Marcinkiewicz, J.; Kobzik, L.; Scavenger receptors and b-glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. **Inflammation Research**, v.61, n.2, p.113–126, 2012.

Keppler-Ross, S.; Douglas, L.; B.; Konopka, J.B.; Dean, N.; Recognition of Yeast by Murine Macrophages Requires Mannan but Not Glucan. **Eukaryotic Cell**, v.9, n.11, p.1776-1787, 2010.

Kersarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J.; Gibson, L., Probiotics in Aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v.274, n.1-3, p.1–14, 2008.

Khalil, H. S.; Mansour, A. T.; Goda, A. M. A.; Omar, E. A., Effect of selenium yeast supplementation on growth performance, feed utilization, lipid profile, liver and intestine histological changes, and economic benefit in meagre, *Argyrosomus regius*, fingerlings. **Aquaculture**, v.501, p.135-143, 2019.

Khan, K. U.; Zuberi, A.; Nazir, S; Fernandes, J. B. K.; Jamil. Z.; Sarwar, H., Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*. **Turkish Journal of Zoology**, v.40, p.704–712, 2016.

Khan, K. U.; Zuberi, A.; Nazir, S.; Ullah, I.; Jamil, Z.; Sarwar, H.; Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological

parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). **Aquaculture Reports**, v.5, p.70–75, 2017.

Kinsella, J. E.; German, B.; Shetty, J., Uricase from fish liver: isolation and some properties. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v.82, n.4, p.621-624, 1985.

Kitajima, T.; Chiba, Y., Selenomethionine metabolism and its toxicity in yeast. **BioMolecular Concepts**, v.4, n.6, 2013.

Klebanoff, S. J.; Kettle, A. J.; Rosen, H.; Winterbourn, C. C.; Nauseef, W. M., Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v.93, n.2, p.185-198, 2013.

Klis, F. M.; Boorsma, A.; De Groot, P. W. J., Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, n.3, p.185–202, 2006.

Köhrle, J.; Gärtner, R., Selenium and thyroid. **Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.23, n.6, p.815-827, 2009.

Kronka, R. N.; Arcadepani, D.; Ramos, L.A.; Utilização da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar e farelo de arroz na alimentação de suínos nas fases inicial, crescimento e terminação (experimento 2). **Arquivos de Veterinária**, v.7, n.1, p.64-77, 1991.

Küçükbay, F. Z.; Yazlak, H.; Karaca, I.; Sahin, N.; Tuzcu, M.; Cakmak, M. N.; Sahin, K., The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. **Aquaculture Nutrition**, v.5, n.6, p.569-576, 2009.

Kuipers, S.; Aerts, P. C.; Van Dijk, H.; Differential microorganism-induced mannose-binding lectin activation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v.36, n.1-2, p.33–39, 2003.

Kumar, N.; Singh, N. P., Effect of dietary selenium on immuno-biochemical plasticity and resistance against *Aeromonas veronii* biovar *sobria* in fish reared under multiple stressors. **Fish & Shellfish Immunology**, v.84, p.38-47, 2019.

Kurtzman, C.P.; Fell, J. W.; Boekhout, T., **The Yeasts, A Taxonomic Study** 5th. ed. Elsevier, Amsterdam, pp.621-628. 2010.

Landry, C. R.; Townsend, J. P.; Hartl, D. L.; Cavalieri, D., Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Ecology**, v.15, n.3, p.575–591, 2006.

Lara-Flores, M., Olivera-Novoa, M. A.; Guzmán-Méndes, B. E.; López-Madrid, W., Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v.216, n.1-4, p.193-201, 2003.

Lazado, C. C.; Caipang, C. M. A.; Brinchmann, M.; F.; Kiron, V., In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. **Veterinary Microbiology**, v.148, n.1-4, p.252-259, 2011.

Lazado, C. C.; Caipang, C. M., Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.39, n.1, p.78-89, 2014.

Lee, S.; Nambi, R. W.; Won, S.; Katya, K.; Bai, S. C., Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**. v.464, p.153–158, 2016.

Legras, J.-L.; Merdinoglu, D.; Cornuet, J.-M.; Karst, F., Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. **Molecular Ecology**, v.16, n.10, 2007.

Lemly, A. D., Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. **Aquatic Toxicology**, v.57, n.1-2, p.39–49, 2002.

Lherm, T.; Monet, C.; Nougère, B.; Soulier, M.; Larbi, D.; Le Gall, C.; Caen, D.; Malbrunot, C., Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. **Intensive Care Medicine**, v.28, n.6, p.797-801, 2002.

Li, P.; Gatlin, D. M.; Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v.251, p.141-152, 2006.

Li, P.; Gatlin III, M. D., Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v.251, p.41–152, 2006.

Li, P.; Gatlin III, D. M., Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobionic™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of

hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. **Aquaculture**, v.231, p.445-456, 2004.

Li, P.; GATLIN III, D. M., Evaluation of brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a feed supplement for hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*). **Aquaculture**, v.219, p.681-692, 2003.

Li, X.H.; Chen, Y.P.; Cheng, Y.F.; Yang, W.L.; Wen, C.; Zhou, Y.M., Effect of yeast cell wall powder with different particle sizes on the growth performance, serum metabolites, immunity and oxidative status of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v.212, p.81–89, 2016.

Librán-Pérez, M.; Costa, M. M.; Figueras, A.; Novoa, B.,  $\beta$ -glucan administration induces metabolic changes and differential survival rates after bacterial or viral infection in turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.82, p.173–182, 2018.

Lim, C.; Webster, C. D., **Tilápia: biology, culture and nutrition**. Haworth Press, Binghamton, New York. p.703, 2006.

Lin, Y-H.; Shiau, S-Y., Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v.250, n.1-2, p.356-363, 2005.

Lin, Y-H., Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth, selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**, v.430, p.114-119, 2014.

Liu, H.; Li, J.; Guo, X.; Liang, Y.; Wang, W., Yeast culture dietary supplementation modulates gut microbiota, growth and biochemical parameters of grass carp. **Microbial Biotechnology**, v.11, n.3, p.551–565, 2018.

Long, M.; Lin, W.; Hou, J.; Guo, H.; Li, L.; Li, D.; Yang, F., Dietary supplementation with selenium yeast and tea polyphenols improve growth performance and nitrite tolerance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.68, p.74–83, 2017.

Lu, D-L.; Limbu, S. M.; Lv, H.-B.; Ma, Q.; Chen, L.-Q.; Zhang, M.-L.; Du, Z.-Y., The comparisons in protective mechanisms and efficiencies among dietary  $\alpha$ -

lipoic acid,  $\beta$ -glucan and l-carnitine on Nile tilapia infected by *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.86, p.758-793, 2018.

Lunger, A. N.; Craig, S. R.; McLean, E., Replacement of fish meal in Cobia (*Rachycentron canadum*) diets using an organically certified protein. **Aquaculture**, v.257, p.393-399, 2006.

Makesh, M.; Sudhesh, P. S.; Cain, K. D.; Systemic and mucosal immune response of rainbow trout to immunization with an attenuated *Flavobacterium psychrophilum* vaccine strain by different routes. **Fish & Shellfish Immunology**, v.44, p.156-163, 2015.

Mansour, A. T-E.; Goda, A. A.; Omar, E. A.; Khalil, H. S.; Estaban, M. A., Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 68, p. 516-524, 2017.

Mariotti, M.; Ridge, P. C.; Zhang, Y.; Lobanov, A. V.; Pringle, T. H.; Guigo, R.; Hatfield, D. L.; Gladyshev, V.N., Composition and evolution of the vertebrate and mammalian selenoproteomes. **PLoS ONE**. v.7, n.3, e33066. 2012.

Marques, A.; Dhont, J.; Sorgeloos, P.; Bossier, P., Evaluation of different yeast cell wall mutants and microalgae strains as feed for gnotobiotically-grown brine shrimp *Artemia franciscana*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.312, n.1, p.15-136, 2004.

Medina-Gali, R. M; Ortega-Villaizan, M. del M.; Mercado, L.; Novoa, B.; Coll, J.; Perez, L., Beta-glucan enhances the response to SVCV infection in zebrafish. **Developmental & Comparative Immunology**, v.84, p.307–314, 2018.

Meena, D. K.; Das, P.; Kumar, S.; Mandal, S. C.; Prusty, A. K.; Singh, S. K., Beta-glucan: An ideal immunostimulant in Aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p, 431–57, 2013.

Meena, D. K.; Das, P.; Kumar, S.; Mandal, S. C.; Prusty, A. K.; Singh, S. K.; Mukherjee, S. C., Beta-glucan: an ideal immunostimulant in **Aquaculture** (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.39, n.3, p.431–457, 2012.

Meng, Y.; Ma, R.; Ma, J.; Han, D.; Xu, W.; Zhang, W.; Mai, K., Dietary nucleotides improve the growth performance, antioxidative capacity and intestinal morphology of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture Nutrition**, v.23, n.3, p. 585-593, 2016.

Meurer, F.; Hayashi, C.; Soares, C.M., Utilização de levedura spray dried na na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Acta Scientiarum**, v.22, n.2, p.479-484, 2000.

Michels, C. A., *Saccharomyces cerevisiae* as a Genetic Model Organism. **Genetic Techniques for Biological Research**, 0-470-84662-3. 2002.

Minami, T.; Tanaka, T.; Takasaki, S.; Kawamura, K.; Hiratsuka, K., In vivo bioluminescence monitoring of defense gene expression in response to treatment with yeast cell wall extract. **Plant Biotechnology**, v.28, n.5, p.481-484, 2011.

Mohammadi, F.; Mousavi, S. M.; Ahmadmoradi, E.; Zakeri, M.; Jahedi, A., Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on survival rate and growth performance of Convict Cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). **Iranian Journal of Veterinary Research**, v.16, n.1, p.59-62, 2015.

Mohan, K.; Ravichandran, S.; Muralisankar, T.; Uthayakumar, V.; Chandirasekar, R.; Seedeve, P.; Rajan, D. K., Potential uses of fungal polysaccharides as immunostimulants in fish and shrimp Aquaculture: A review. **Aquaculture**, v.500, p.250-263, 2018.

Montoya, L. N. F.; Favero, G. C.; Zanuzzo, F. S.; Urbinati, E. C.; Distinct  $\beta$ -glucan molecules modulates differently the circulating cortisol levels and innate immune responses in matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.83, p314-320, 2018.

Mortimer, R. K., Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. **Genome Research**, v.10, n.4, p.403–409, 2000.

Moslehi-Jenabian, S.; Lindegaard, L.; Jespersen, L.; Beneficial Effects of Probiotic and Food Borne Yeasts on Human Health. **Nutrients**, v.2, n.4, p.449–473, 2010.

Murray, A. P.; Marchant, R., Nitrogen utilization in rainbow trout fingerlings (*Salmo gairdneri* Richardson) fed mixed microbial biomass. **Aquaculture**, v.54, n.4, p.263–275, 1986.

Mydland, L. T.; Frøyland, J. R. K.; Skrede, A., Composition of individual nucleobases in diets containing different products from bacterial biomass grown on natural gas, and digestibility in mink (*Mustela vison*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v.92, n.1, p.1–8, 2008.

Navarrete, P.; Tovar-Ramírez, D.; Use of Yeasts as Probiotics in Fish Aquaculture. In: **Sustainable Aquaculture Techniques** (Hernandez-Vergara, M. ed.). p. 135–172. InTech, Rijeka, Croácia., 2014.

Nawaz, A.; Bakhsh Javid, A.; Irshad, S.; Hoseinifar, S.H.; Xiong, H., The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. **Fish and Shellfish Immunology**, v.76, p. 272-278, 2018.

Nayak, S. K.; Mukherjee, S. C.; Screening of gastrointestinal bacteria of Indian major carps. **Aquaculture Research**, v. 42, n. 7, p.1034–1041, 2010.

Nhi, N. H. Y.; Da, C. T.; Lundh, T.; Lan, T. T.; Kiessling, A.; Comparative evaluation of Brewer's yeast as a replacement for fishmeal in diets for tilapia (*Oreochromis niloticus*), reared in clear water or biofloc environments. **Aquaculture**, v.495, p.654–660, 2018.

Nissen, P.; Nielsen D.; Arneborg, N., Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non- *Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell–cell contact-mediated mechanism. **Yeast**, v.20, p.331–341, 2003.

Oliva-Teles, A.; Gonçalves, P., Partial replacement of fishmeal by brewers yeast *Saccaromyces cerevisiae* in diets for sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles. **Aquaculture**, v.202, p.269–278, 2001.

Onofre, B. S.; Bertodo, I. C.; Abatti, D.; Refosco, D., Chemical Composition of the Biomass of *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen ex E. C. Hansen, 1883) Yeast obtained from the Beer Manufacturing Process. **International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology**, v.2, n.2, 2017.

Ortuño, J.; Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Esteban, M.A.; Meseguer, J., Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.85, n.1-2, p.41–50, 2002.

Øverland, M.; Skrede, A., Yeast derived from lignocellulosic biomass as a sustainable feed resource for use in Aquaculture. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.97, p.733-742, 2017.

Øverland, M.; Karlsson, A.; Mydland, L. T.; Romarheim, O. H.; Skrede, A., Evaluation of *Candida utilis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts as protein sources in diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, v.402-403, p.1–7, 2013.

Ozório, R. O. A.; Portz, L.; Borghesi, R.; Cyrino, J. E. P., Effects of dietary yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation in practical diets of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Animals**, v.2, n.1, p.16–24, 2012.

Ozório, R. O. A.; Turini, B. G. S.; Môro, G.V.; Oliveira, L. S. T.; Portz, L.; Cyrino, J. E. P., Growth, nitrogen gain and indispensable amino acid retention of pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887) fed different brewers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) levels. **Aquaculture Nutrition**, v.16, p.276–283, 2010.

Pacheco, M. T.; Caballero-Córdoba, G. M.; Sgarbieri, V. C.; Composition and Nutritive Value of Yeast Biomass and Yeast Protein Concentrates. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.43, n.6, p.601-612, 1997.

Papp L. V.; Lu, J.; Holmgren, A.; Khanna, K. K., From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.9, n.7, p.775-806, 2007.

Pardo-Gamboa, B. S.; Quintero-Pinto, L. G.; Pezzato, L. E.; Silva, F. A.; Quintero-Pardo, A. M. P., Nutrientes digestíveis da Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Íntegra e Autolisada para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n.1, p.26-38, 2011.

Pereira-da-Silva, E. M.; Pezzato, L. E., Respostas da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) à atratividade e palatabilidade de ingredientes utilizados na alimentação de peixes. **Revista Brasileira de Tecnologia**, n.5, v.29, p.1-11, 2000.

Peres, H.; Oliva-Teles, A., The effect of dietary ribonucleic acid incorporation in performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. **Aquaculture**, v.215, p.245–253, 2003.

Pérez-Corona, T.; Madrid, Y.; Cámara, C., Evaluation of selective uptake of selenium (Se(IV) and Se(VI)) and antimony (Sb(III) and Sb(V) species by baker's yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*). **Analytica Chimica Acta**, v.345, 249–55, 1997.

Pérez-Sánchez, T.; Ruiz-Zarzuela, I.; de Blas, I.; Balcázar, J. L., Probiotics in **Aquaculture**: a current assessment. **Reviews in Aquaculture**, v.6, n.3, p.133–146, 2013.

Petit, J.; Wiegertjes, G. F., Long-lived effects of administering  $\beta$ -glucans: Indications for trained immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v.64, p.93–102, 2016.

Pietretti, D.; Vera-Jimenez, N. I.; Hoole, D.; Wiegertjes, G. F., Oxidative burst and nitric oxide responses in carp macrophages induced by zymosan, MacroGard® and selective dectin-1 agonists suggest recognition by multiple pattern recognition receptors. **Fish & Shellfish Immunology**, v.35, n.3, p.847–857, 2013.

Pilarski, F.; Ferreira de Oliveira, C. A.; Darpossolo de Souza, F. P. B.; Zanuzzo, F. S., Different  $\beta$ -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish & Shellfish Immunology**, v.70, p.25-29, 2017.

Plata, M. R.; Koch, C.; Wechselberger, P.; Herning, C.; Lendl, B., Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p.8241–8250, 2013.

Pongpet, P.; Ponchunchoovong, S.; Payooha, k., Partial replacement of fish meal by brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in the diets of Thai Panga (*Pangasianodon hypophthalmus* x *Pangasius bocourti*). **Aquaculture Nutrition**, v.22, p.575-585, 2016.

Pooramini, M.; Kamali, A.; Hajimoradloo, A.; Alizadeh, M.; Ghorbani. R., Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth

parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. **International Aquatic Research**, v.1, n.1, p.39–44, 2009.

Ramos, M. A.; Gonçalves, J. F.; Batista, S.; Costas, B.; Pires, M. A.; Rema, P.; Ozório, R. O., Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.1, p.19-26, 2015.

Rayman, M. P.; Goenaga Infante, H.; Sargent, M., Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v.100, n.2, p.238–253, 2008.

Refstie, S.; Baeverfjord, G.; Seim, R. R.; Elvebø, O., Effects of dietary yeast cell wall B-glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sun flower and soybean meal. **Aquaculture**, v.305, p.109–116, 2010.

Refstie, S.; Landsverk, T.; Bakke-McKellep, A. M.; Ringø, E.; Sun-dby, A.; Shearer, K. D.; Krogdahl, A., Digestive capacity, intestinal morphology, and microflora of 1-year and 2-year old Atlantic cod (*Gadus morhua*) fed standard or bioprocessed soybean meal. **Aquaculture**, v.261, p.269–284, 2006.

Reza, A.; Abdolmajid, H.; Abbas, M.; Abdolmohammad, A. K., Effect of dietary prebiotic inulin on growth performance, intestinal microflora, body composition and hematological parameters of juvenile Beluga, *Huso huso* (Linnaeus 1758). **Journal of the World Aquaculture Society**, v.40, p.771–779, 2009.

Rezaei, A. V.; Ahmadifard, N.; Tukmechi, A.; Agh, N., Improvement of reproductive indices, lysozyme activity, and disease resistance in live-bearing ornamental fish, *Poecilia latipinna* using *Artemia* supplementation with treated yeast cell, *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture Research**, v.50, n.1, p.72–79, 2019.

Rider, S. A.; Davies, S. J.; Jha, A. N.; Clough, R.; Sweetman, J. W., Bioavailability of co-supplemented organic and inorganic zinc and selenium sources in a white fishmeal-based rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diet. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.94, n.1, p.99-110, 2010.

Rine, J.; The Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in Molecular and Cellular Biology: A Smaller but not Lower Eucaryote. **American Zoology**, v.29, p.605-616, 1989.

Ringø E.; Olsen, R. E.; Vecino, J. L. G.; Wadsworth, S.; Song, S. K., (2012) Use of immunostimulants and nucleotides in Aquaculture: a review. **Marine Science Research & Development**, v.2, n.2, 2012.

Ringø, E.; Olsen, R.; Gifstad, T.; Dalmo, R.; Amlund, H.; Hemre, G.; Bakke, A., Prebiotics in Aquaculture: a review. **Aquaculture Nutrition**, v.16: p.117-136, 2010.

Riquelme, A. J.; Calvo, M. A.; Guzman, A. M.; Depix, M. S.; García, P.; Pérez C.; Arrese, M.; Labarca, J. A., *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.36, n.1, p.41–43, 2003.

Rodríguez, P. H.; Rojas, M. S.; Efecto de dietas enriquecidas con vitamina e y selenio orgánico en el comportamiento productivo y calidad funcional del filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v.25, n.2, p.213–225, 2014.

Rodríguez, A.; Cuesta, A.; Ortuño, J.; Esteban, M.; Meseguer, J., Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.96, n.3-4, p.183–192, 2003.

Rodríguez, A.; Cuesta, A.; Ortuño, J.; Esteban, M. A.; Meseguer, J.; Immunostimulant properties of a cell wall-modified whole *Saccharomyces cerevisiae* strain administered by diet to seabream (*Sparus aurata* L.). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.96, p.183-192, 2003.

Rodríguez, I.; Novoa, B.; Figueras, A., Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n.3, p.239-249, 2008.

Romanio, M.R.; Coraine, L. A.; Maielo, V. P.; Abramczyc, M. L.; Souza, R. L.; Oliveira, N. F.; Fungemia por *Saccharomyces Cerevisiae* em Paciente Pediátrico

Após Tratamento com Probiótico. **Revista Paulista de Pediatria**, v.35, n.3, p.361364, 2017.

Rumsey, G. L.; Kinsella, J. E.; Shetty, K. J., Hughes, S. G., Effect of high dietary concentrations of brewer's dried yeast on growth performance and liver uricase in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**, v.33, n.3-4, p.177-183, 1991.

Rumsey, G. L.; Hughes, S. G.; Kinsella, J. L., Use of Dietary Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nitrogen by Lake Trout. *Journal of the World Aquaculture Society*. v.21, n.3, p.205–209, 1990.

Rumsey, G. L.; Winfree, R. A.; Hughes, S. G., Nutritional value of dietary nucleic acids and purine bases to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v.108, n.1-2, p.97–110. 1992.

Sado, R. Y.; Bicudo, A. J.; Cyrino, J. E., Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 385-393, 2013.

Salah, A. S.; El Nahas, A. F.; Mahmoud, S., Modulatory effect of different doses of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan on the expression of antioxidant, inflammatory, stress and immune-related genes of *Oreochromis niloticus* challenged with *Streptococcus iniae*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.70, p.204–213, 2017.

Salze, G.; McLean, E.; Schwarz, M. H.; Craig, S. R., Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. **Aquaculture**, v.274, p.148–152, 2008.

Sanchez-Muniz, F. J.; Higuera, M, de La., Mataix, F. J.; Valera, G., The yeast *Ransenua anomala* as a protein source for rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Haematological aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v.63, n.1, p.153–157, 1979.

Sarang, G. K.; Romagné, F.; Castellano, S., Distinct Patterns of Selection in Selenium-Dependent Genes between Land and Aquatic Vertebrates. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, n.7, p.1744–1756. 2018.

Schlag, k. A.; Ystgaard, K., Europeans and Aquaculture: perceived differences between wild and farmed fish. **British Food Journal**, v.115, v.2, p.209–222, 2013.

Schrauzer, G.N.; Selenomethionine: A Review of Its Nutritional Significance, Metabolism and Toxicity. **The Journal of Nutrition**. v.130, n.7, p.1653–1656, 2000.

Schulz, E.; Oslage, H. J., Composition and nutritive value of single-cell protein (SCP). **Animal Feed Science and Technology**. v.1, p.9-24, 1976.

Schwarz, k.; Foltz, C. M., Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Nutrition Reviews**. v.36, n. 11, p. 338-340, 1978.

Sele, V.; Ørnsrud, R.; Sloth, J. J.; Berntssen, M. H. G.; Amlund, H., Selenium and selenium species in feeds and muscle tissue of Atlantic salmon. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v.47, p.124–133, 2018.

Selim, K. M.; Reda, R. M., Beta-glucans and mannan oligosaccharides enhance growth and immunity in Nile tilapia. **North American Journal of Aquaculture**, v.77, n.1, p.22-30, 2015.

Selim, k.; El-hofy, H.; Khalil, R.H.; The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture International**, v.22, n.2, 2013.

Sharma, V. K.; McDonald, T. J.; Sohn, M.; Anquandah, G. A. K.; Pettine, M.; Zboril, R., Assessment of toxicity of selenium and cadmium selenium quantum dots: A review. **Chemosphere**, v.188, p.403–413, 2017.

Shelby, R. A.; Lim, C.; Yildirim-Aksoy, M.; Welker, T. L.; Klesius, P. H., Effects of yeast oligosaccharide diet supplements on growth and disease resistance in juvenile Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of Applied Aquaculture**. v.21, n.1, p.61-71, 2009.

Shiau, S-Y.; Gabaudan, J.; Lin, Y-H.; Dietary nucleotide supplementation enhances immune responses and survival to *Streptococcus iniae* in hybrid tilapia fed diet containing low fish meal. **Aquaculture Reports**, v.2, p.77-81, 2015.

Shurson, G.C., Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 60–76, 2018.

Singh, V.; Rathore, G.; Kapoor, D.; Mishra, B. N.; Lakra, W. S., Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water. **Indian Journal of Microbiol**, v.48, p.453-458, 2008.

Soares, M. P.; Oliveira, F. C.; Cardoso, I. L.; Urbinati, E. C.; Meldau de Campos, C.; Hisano, H., Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.73, p.133–140, 2018.

Solomon, S. G.; Ataguba, G. A.; Itodo, G. E., Performance of *Clarias gariepinus* Fed Dried Brewer's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Slurry in Replacement for Soybean Meal. **Journal of Nutrition and Metabolism**, v.2017, 8936060, 2017.

Soltanian, S.; Dhont, J.; Sorgeloos, P.; Bossier, P., Influence of different yeast cell-wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, n.1, p.141–153, 2007.

Song, S. K.; Beck, B. R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, H. D.; Ringø, E., Prebiotics as immunostimulants in **Aquaculture**: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v.40, n.1, p.40–48. 2014.

Spring, P.; Wenk, C.; Connolly, A.; Kiers, A., A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v.3, n.8, 2015.

Spring, P.; Wenk, C.; Connolly, A.; Kiers, A., A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 3, n.8, 2015.

Stones, C. S.; Mills, D. V., The use of live yeast and yeast culture products in **Aquaculture**. **International Aquaculture Feed**, v.7, n.5, p.28-34, 2004.

Stratev, D.; Stoev, S.; Vashin, I.; Daskalov, H., Some varieties of pathological changes in experimental infection of carps (*Cyprinus carpio*) with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Aquaculture Engineering and Fisheries Research**, p.191–202, 2015.

Tafalla, C.; Børgwald, J.; Dalmo, R. A., Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. **Fish & Shellfish Immunology**, v.35, n.6, p.1740-1750, 2013.

Tapiero, H.; Townsend, D.; Tew, K., The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, n.3-4, p.134–144, 2003.

Torrecillas, S.; Montero, D.; Izquierdo, M., Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish & Shellfish Immunology**, v.36, p.525–544, 2014.

Torrecillas, S.; Makol, A.; Caballero, M. J.; Montero, D.; Robaina, L.; Real, F.; Sweetman, J., Immune stimulation and improved infection resistance in European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish & Shellfish Immunology**, v.23, p.969–981, 2007.

Torrecillas, S.; Ribero-Ramírez, F.; Izquierdo, M.S.; Caballero, M.J.; Makol, A.; Soares-Bregua, P.; Fernandez-Montero, A.; Rottlant, J.; Montero, D., Feeding European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): Na effective tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects? **Fish & Shellfish Immunology**, v. 81, p. 10-20, 2018.

Tovar-Ramirez, D.; Infante, J. Z.; Cahu, C.; Gatesoupe, F.J.; Vazquez Juarez R. Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. **Aquaculture**, v.234, n.1-4, 415-27.

Vallejos-Vidal, E.; Reyes-López, F.; Teles, M.; MacKenzie, S., The response of fish to immunostimulant diets. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 56, p. 34-69, 2016.

Van Asbeck, E.C.; Hoepelman, A. I; Scharringa, J.; Herpers, B.L.; Verhoef, J., Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by

enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells. **BMC Microbiology**, v.8, p229–38.

Vetvicka, V.; Vannucci, L.; Sima, P., The Effects of  $\beta$ -Glucan on Fish Immunity. **North American Journal of Medical Science**, v.5, n.10, p.580-588, 2013.

Vidakovic, A.; Langeland, M.; Sundell, K.; Sundh, H.; Olstorpe, M.; Vielma, J.; Kiessling, A.; Lundh, T., Evaluation of growth performance and intestinal barrier function in Arctic Charr (*Salvelinus alpinus*) fed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Rhizopus oryzae*) and blue mussel (*Mytilus edulis*). **Aquaculture Nutrition**, v.22, n.2, p. 1348-1360, 2016.

Vieira, E. F.; Carvalho, J.; Pinto, E.; Cunha, S.; Almeida, A. A.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. Nutritive value, antioxidant activity and phenolic compounds profile of brewer's spent yeast extract. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.52, p.44–51, 2016.

Wang e Chen, 2006; Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. **Biotechnology Advances**, v.24, n.5, p.427–451, 2006.

Wang, W.; Sun, J.; Liu, C.; Xue, Z., Application of immunostimulants in Aquaculture: current knowledge and future perspectives. **Aquaculture Research**, v.48, p.1–23, 2017

Wang, A.; Ran, C.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Ding, Q.; Yang, Y.; Olsen, R. E.; Ringø, E.; Bindelle, J.; Zhou, Z., Use of probiotics in Aquaculture of China—a review of the past decade. **Fish & Shellfish Immunology**, v.89, p.734-755, 2018.

Whittington, R.; Lim, C.; Klesius, P.H., Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 217-225, 2005.

Wi, G. R.; Hwang, J. Y.; Kwon, M.-G.; Kim, H. J.; Kang, H. A.; Kim, H.-J.; Protective immunity against nervous necrosis virus in convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* following vaccination with virus-like particles produced in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Veterinary Microbiology**, v.177, n.1-2, p.214–218, 2015.

Wood, A.J.; Gold, H.S.; Moellering-Jr, R. C., Antimicrobial-Drug Resistance. **New England Journal of Medicine**, v.335, p.1445–1453, 1996.

Xu, H.; Ai, Q.; Mai, K.; Xu, W.; Wang, J.; Ma, H.; Zhang, W.; Wang, X.; Liufu, Z., Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**, v.307, n.1-2, p. 75–82, 2010.

Xu, L.; Ran, C.; He, S.; Xhang, J.; Hu, J.; Yang, Y.; Du, Z.; Yand, Y.; Zhou, Z.; Effects of dietary yeast nucleotides on growth, non-specific immunity, intestine growth and intestinal microbiota of juvenile hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aureus*. **Animal Nutrition**, v.1, n.3, p.244-251, 2015.

Yamada, E. A.; Sgarbieri, V. C.; Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Protein Concentrate: Preparation, Chemical Composition, and Nutritional and Functional Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.3931–3936, 2005.

Yan, N.; Xu, K.; Li, X.; Liu, Y.; Bai, Y.; Zhang, X., Han, B.; Chen, Z.; Zhang, Z.; Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* serves as novel carrier for oral DNA vaccines in *Carassius auratus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.47, n.2, p.758–765, 2015.

Yousri, R. F.; Single cell protein its potential use for animal and human nutrition. **World Review of Animal. Production**, v.18, n.23, p.46-67, 1982.

Yu, H. H.; Han, F.; Xue, M.; Wang, J.; Tacon, P.; Zheng, Y. H., Wu, X. F, Zhang, Y. J. Efficacy and tolerance of yeast cell wall as an immunostimulant in the diet of Japanese seabass (*Lateolabrax japonicus*). **Aquaculture**, v.432, p.217–224, 2014.

Zeidan, M.B.; Lourdes Carmona, Zara, S.; Marcos, F. A.; *FLO11* Gene Is Involved in the Interaction of Flor Strains of *Saccharomyces cerevisiae* with a Biofilm-Promoting Synthetic Hexapeptide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n..19, 2013

Zerai, D.B.; Fitzsimmons, K. M.; Collier, R.J.; Duff, G. C., Evaluation of brewer's waste as partial replacement of fish meal protein in Nile tilapia,

*Oreochromis niloticus*, diets. **Jornal of the World Aquaculture Society**, v.39, p.556–564, 2008.

Zhang A.W.; Lee, B.D.; Lee, S.K.; Lee, K.W.; Na, G.H., Song, K.B.; Lee, C.H., Effects of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Components on Growth Performance, Meat Quality, and Ileal Mucosa. **Development of Broiler Chicks Poultry Science**, v. 84, n. 7, p 1015–1021, 2005.

Zheng, L.; Feng, L.; Jiang, W-D.; Wu, P.; Tang, L.; Kuang, S-Y.; Zeng, Y-Y.; Zhou, X-Q.; Liu, Y., Selenium deficiency impaired immune function of the immune organs in young grass carp. (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 77, p. 53-70, 2018.

Zhou, M.; Liang, R.; Mo, J.; Yang, S.; Gu, N.; Wu, Z., Babu, S.; Jun Li, V.; Huang, Y., Lin, L., L. Effects of brewer's yeast hydrolysate on the growth performance and the intestinal bacterial diversity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v.484, p.139–144. 2018.

Zhu, M.; Wu, S. The growth performance and nonspecific immunity of loach *Paramisgurnus dabryanus* as affected by dietary  $\beta$ -1,3-glucan. **Fish & Shellfish Immunology**, v.83, p.368–372, 2018.

## **CAPÍTULO 2**

**Efeito sinérgico da levedura selenizada e parede celular de levedura  
*Saccharomyces cerevisiae* no desempenho produtivo e na resposta  
imunológica do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

## **Efeito sinérgico da levedura selenizada e da parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* no desempenho produtivo e na resposta imunológica do pacu (*Piaractus mesopotamicus*)**

### **RESUMO**

Os produtos imunoestimulantes derivados da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, têm papel importante no crescimento e sobrevivência dos animais na aquicultura. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação dietética com levedura selenizada (fonte de selênio orgânico) e parede celular de levedura na resposta imunológica do pacu após desafio bacteriano. Foram utilizados 160 pacus ( $84,2 \pm 1,2$ g) distribuídos em quatro grupos que receberam diferentes dietas experimentais: Ctrl (Controle: apenas dieta basal); Par (Parede de levedura  $1\text{g kg}^{-1}$ ), Sel (Levedura selenizada  $0,6\text{mg kg}^{-1}$ ), e Sel+Par (Levedura selenizada  $0,6\text{mg kg}^{-1}$  + Parede de levedura  $1\text{g kg}^{-1}$ ). Após seis semanas de alimentação, os animais foram pesados para avaliação do desempenho produtivo e desafiados com *Aeromonas hydrophila* inativada para indução ao estímulo inflamatório. Antes do desafio e após 6 e 24 horas do estímulo, foram realizadas análises imunológicas. Os grupos testados não demonstraram diferença quanto ao desempenho produtivo e morfometria intestinal. Os animais que receberam selênio orgânico na dieta mostraram melhores resultados para a atividade respiratória dos leucócitos e lisozima. O uso da parede celular de levedura elevou o cortisol plasmático. Entretanto, não houve efeito deletério do cortisol no sistema imunológico quando a parede de levedura foi fornecida junto à levedura selenizada. Com base neste estudo, pode-se concluir que a utilização de levedura selenizada, com ou sem parede celular de levedura, incrementa o sistema imunológico dos peixes.

**Palavras-chave:** Imunoestimulante, parede celular de levedura, estresse, pacu.

## 1. INTRODUÇÃO

A presença de patógenos no organismo animal desencadeia uma série de reações, como a ativação de substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos que direcionam leucócitos granulares para atuar no sítio da inflamação (Haslett, 1997; Van der Vaart, Spaink e Meijer 2012, Klebanoff et al., 2013). A eliminação dos microrganismos fagocitados é resultado da produção de compostos antimicrobianos formados por espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e íon cloreto ( $Cl^-$ ) produzidos por ação das enzimas superóxido dismutase (SOD) e mieloperoxidase (MPO) em um processo chamado *burst* oxidativo (Xu et al., 2010; Förstermann e Sessa, 2012; Klebanoff et al., 2013). Em um estado fisiológico normal, as EROs são mantidas em equilíbrio com os antioxidantes nas células (Sastre et al., 2000). No entanto, situações de estresse, promovem um desequilíbrio neste balanço, afetando negativamente as funções fisiológicas normais do animal (kumar et al., 2017).

Um método promissor para manutenção da saúde dos peixes é o uso de imunostimulantes, compostos que ativam os mecanismos de defesa inata dos animais, promovendo redução do estresse e resistência à ação de patógenos (Ringø et al., 2012; Barman et al., 2013; Tafalla, Børgwald e Dalmo, 2013; Song et al., 2014; Deivasigamani e Subramanian, 2016; Dawood e Koshio, 2016; Vallejos-Vidal et al., 2016). A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um importante imunostimulante cujos benefícios estão relacionados à presença de  $\beta$ -glucano (Navarrete e Tovar-Ramírez, 2014; Zhou et al., 2018), quitina (Cuesta et al., 2003; Eason et al., 2006; Kordon et al., 2018) e à ação das mananoligossacarídeos (MOS) presentes em sua composição (Sauerwein, Schmitz e Hiss, 2007). O MOS apresenta propriedade prebiótica que limita a colonização de patógenos no intestino, melhorando a integridade da mucosa intestinal, a digestão e induzindo a produção de muco (Spring et al., 2015; Carbone et al., 2016; Mahmoud et al., 2016; Nawaz et al., 2018; Torrecillas et al., 2018). Além disso, o MOS também pode ativar proteínas de sinalização como as Lectinas Ligadoras de Manose (MBL) que através das enzimas secundárias, como a Serina Protease Associada às MBL (MASP), iniciam a cascata de reações que amplificam as

respostas imunológicas em peixes (Boshra et al., 2006; Refstie et al., 2010; Akhter et al., 2015; Soares et al., 2018; Abu-Elala et al., 2018).

O selênio (Se) é um micronutriente traço essencial, fundamental na manutenção da condição fisiológica normal dos animais, incluindo peixes (NRC, 1993). *S. cerevisiae* apresenta grande capacidade de incorporação de selênio inorgânico (seleneto, selenito e selenato) do meio de cultivo (Pérez-Corona, 1997; Kitajima e Chiba 2013; Khakpour et al., 2014) e de transforma-lo na forma orgânica de selenometionina (SeMet) ou selenocisteína (CeCis) (Kieliszek et al., 2015). A levedura submetida ao processo de incorporação do selênio é conhecida como levedura selenizada.

Na forma de SeMet, o Se fica mais biodisponível para absorção e com menor capacidade de intoxicação do organismo em relação a suas formas inorgânicas (Le e Fotedar, 2014; Saleh et al., 2014). A SeMet faz parte das selenoenzimas, como a glutathiona peroxidase (Rotruck et al., 1973; Schwarz e Foltz, 1978), que tem papel fundamental na proteção celular contra os danos causados pelas EROs. Além da atividade antioxidante, o selênio também desempenha um papel importante no crescimento, na expressão de enzimas e proteínas do sistema imune (Lin, 2014), na manutenção das funções efetoras leucocitárias, incluindo aderência, migração, produção de citocinas e fagocitose (Biller-Takahashi et al., 2015; Kumar et al., 2017).

A levedura selenizada e a parede celular de levedura atuam de diferentes maneiras na modulação do sistema imunológico e redução do estresse oxidativo em peixes. Apesar dos inúmeros benefícios promovidos por estes aditivos na saúde dos animais de produção (Lazado e Caipang, 2014; Ashouri et al., 2015; Ramos et al., 2015; Saffari et al., 2017), a compreensão dos mecanismos envolvidos na proteção dos animais contra patógenos e a interação conjunta desses aditivos ainda são limitadas. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da suplementação de levedura selenizada e parede celular de levedura no desempenho produtivo e na resposta imune do pacu, uma espécie muito importante para à aquicultura brasileira.

O Pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), é um peixe encontrado no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia (Sado, Bicudo e

Cyrino, 2013, Valladão, Gallani e Pilarski, 2018) cuja criação vem se intensificando nos últimos anos devido à rusticidade, elevada taxa de crescimento, facilidade de manejo e aceitação da carne pelo mercado consumidor (Jomori et al., 2005; Urbinati, Gonçalves e Takahashi, 2010). Além disso, o pacu tem fisiologia intimamente relacionada a outras espécies (*Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*) de importância comercial nos países da América do Sul (Jomori et al., 2005; Kumar et al., 2017).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 010994/18), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal.

### 2.1. Período de alimentação

Foram utilizados 160 pacus ( $84,2 \pm 1,2\text{g}$ ) oriundos da mesma desova, provenientes do Laboratório de Reprodução de Peixes do Caunesp, os quais foram distribuídos em 16 aquários ( $0,1 \text{ m}^3$ ) com renovação constante de água e oxigenação suplementar. O período de aclimatação às condições laboratoriais durou 14 dias e em seguida, os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia (3% do peso vivo) por seis semanas com as dietas experimentais. O experimento foi realizado com quatro réplicas e cada uma foi representada por um aquário. A temperatura e o oxigênio da água foram monitorados diariamente e a amônia, pH e nitrito a cada 15 dias. Os parâmetros de qualidade de água se mantiveram adequados à produção da espécie (Urbinati, Gonçalves e Takahashi, 2010), a temperatura média foi  $26,8 \pm 0,7^\circ\text{C}$ , o oxigênio dissolvido  $5,2 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ , pH  $7,3 \pm 0,1$ , a amônia e nitrito  $0,18 \pm 0,06 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,03 \pm 0,04 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente. Após o período de alimentação experimental, todos os peixes foram anestesiados com solução de benzocaína ( $0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) e pesados para realização das análises descritas abaixo.

## 2.2. Dieta

Foram formuladas quatro dietas isoproteicas e isonergéticas com suplementação vitamínica e mineral (Tabela 1). Uma dieta extrudada básica foi misturada mecanicamente com 2% de óleo vegetal e suplementada com parede celular de levedura 1g kg<sup>-1</sup> (Par), com levedura selenizada 0,6mg kg<sup>-1</sup> (Sel) ou com levedura selenizada 0,6mg + parede de levedura 1g kg<sup>-1</sup> (Sel+Par). O grupo controle (Ctrl) não teve adição de parede celular ou levedura selenizada. A fonte de levedura selenizada e de parede celular de levedura (*S. cerevisiae*) foi proveniente dos produtos Selsaf 3000® e Safmannam® (Phileo - Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, França) e o nível de adição seguiu a recomendação do fabricante.

**Tabela 1.** Composição percentual da dieta básica experimental.

Ingredientes %	CTRL	PAR	SEL	SEL+PAR
Farinha de vísceras	7,5	7,5	7,5	7,5
Farinha de peixe	4,0	4,0	4,0	4,0
Farinha de soja	35,8	35,8	35,8	35,8
Milho	14,0	14,0	14,0	14,0
Farelo de trigo	12,5	12,5	12,5	12,5
Óleo de soja	3,0	3,0	3,0	3,0
Quirera de arroz (Arroz)	9,0	9,0	9,0	9,0
Farelo de arroz	3,0	3,0	3,0	3,0
Farinha de algodão	4,5	4,5	4,5	4,5
NaCl	0,0	0,0	0,0	0,0
Fosfato de cálcico	3,6	3,6	3,6	3,6
Calcário	1,6	1,6	1,6	1,6
Antifúngico (filax)	0,15	0,15	0,15	0,15
BHT, antioxidante	0,05	0,05	0,05	0,05
Suplemento vitamínico e mineral <sup>1</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5
L- Lisina HCL	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-Metionina	0,3	0,3	0,3	0,3
TOTAL	100	100	100	100
Óleo de Soja	2,00	2,00	2,00	2,00
Selsaf 3000® <sup>2</sup>	0,00	0,00	0,06	0,06
Safmannam® <sup>3</sup>	0,00	0,10	0,00	0,10
Composição analisada				
Matéria Seca (%)	90,66	90,75	90,72	91,32
Proteína Bruta (%)	30,0	30,02	30,03	30,35
Extrato Etéreo (%)	7,01	7,01	7,01	7,02
Fibra Bruta (%)	4,62	4,62	4,62	4,62

Matéria Mineral (%)	6,52	6,52	6,52	6,56
Extrato não nitrogenado <sup>4</sup> (%)	37,38	37,44	37,40	37,64
Energia bruta (Kcal/kg)	4077	4082	4079	4110

<sup>1</sup>Agromix Nutrição Animal. Jaboticabal-SP. Níveis de garantia kg do produto. Ácido Fólico 1200,00 mg/kg; Ácido Pantotênico 10.000,00 mg/kg; Biotina 200,00 mg/kg; Cobalto 80,00 mg/kg; Cobre 3.500,00 mg/kg; Colina 100,00 g/kg; Iodo 160,00 mg/kg; Inositol 25,00 g/kg; Manganês 10.000,00 mg/kg; Selênio 100,00 mg/kg; Vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; Vitamina B1 4.000,00 mg/kg; Vitamina B2 4.000,00 mg/kg; Vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; Vitamina C 60,00 g/kg; Vitamina B2 4.000,00 mg/kg; Vitamina B6 3.500,00 mg/kg; Vitamina D3 600.000,00 UI/kg; Vitamina E 30.000,00 UI/kg; Vitamina K3 3.000,00 mg/kg; Zinco 24,00 mg/kg; Ácido Nicotínico 20,00 g/kg; Ferro 20,00 g/kg;

<sup>2</sup>Levedura Selênizada (Selsaf 3000®, Phileo/Lesaffre, França)

<sup>3</sup>Parede celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae*:

<sup>4</sup>ENN = MS-(PB+EE+MM+FB).

### 2.3. Desempenho produtivo

O desempenho produtivo foi avaliado conforme os cálculos a seguir: Ganho de peso =  $Peso\ final\ (g) - Peso\ inicial\ (g)$ ; Conversão alimentar aparente =  $(Consumo\ de\ ração\ (g)) / (ganho\ de\ peso\ (g))$ ; Taxa de crescimento específico =  $(Ln\ massa\ final - Ln\ massa\ inicial \times 100) / (ndias)$  e Eficiência alimentar =  $(Ganho\ de\ peso\ (g)) / (consumo\ de\ alimento\ (g)) \times 100$ .

### 2.4. Morfometria intestinal

Ao término do período de alimentação com as dietas experimentais, o segmento anterior do intestino, localizado dois centímetros a partir do estômago, foi coletado de oito peixes por tratamento para análise da morfometria intestinal. Cada fragmento do intestino foi fixado em solução de formalina tamponada (10%) por 24 horas e desidratados em série crescente de álcool, clarificados com xilol, incluídos em parafina a 60°C. Os fragmentos foram divididos em secções de 5µm, separados em lâminas, corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Periodic acid-Schiff (PAS) e fotografados em microscópio óptico Nikon E200 contendo sistema de captura de imagem Motic 5.0, para análise da altura e largura das vilosidades e contagem de células calciformes segundo Cerezuela et al., (2012) e Dimitroglou et al., (2010).

## 2.5. Desafio com *Aeromonas hydrophila*

A bactéria *A. hydrophila* utilizada no desafio foi previamente isolada de pacu naturalmente infectado e identificada por sequenciamento do gene 16sRNA (GenBank: MH591949.1). A estirpe foi inativada por banho-maria à 56°C por 30 min e inoculada na cavidade celomática de 30 peixes por grupo na dose previamente determinada pela DL<sub>50</sub> ( $8,1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>; 1% p/v) para estimular o sistema imunológico do pacu. Antes, 6 e 24 horas após o desafio (HPD), 10 peixes por grupo tiveram o sangue coletado por punção do vaso caudal para realização das análises imunológicas.

## 2.6. Análises imunológicas

### 2.6.1. Atividade respiratória dos leucócitos (*burst oxidativo*), Lisozima e Complemento (Via alternativa)

A atividade respiratória de leucócitos (*Burst oxidativo*) foi mensurada a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), seguindo o protocolo de Anderson e Siwicki (1995) modificado para o pacu (Biller-Takahashi et al., 2013). Após a amostragem, 0,1 mL de sangue foi adicionado a um volume igual de tampão NBT (Sigma-Aldrich, MO, USA) (0,2%) por 30 min a 25°C. Após a incubação, 50 µL da solução foi adicionada à 1 mL de N, N-dimetilformamida (Sigma-Aldrich, MO, USA), e em seguida centrifugada a 3.000G por 5 min. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (Unico 2100) a 540 nm de absorbância.

Para as demais análises imunológicas, parte do sangue foi mantida à temperatura ambiente por quatro horas para separação do soro que foi utilizado na determinação da atividade da lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento. A produção de lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Biller-Takahashi et al (2014). Brevemente, 125 µL de uma solução contendo *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL<sup>-1</sup>) foi misturada com 50 µL de soro e incubada por 1 hora em leitor de microplacas e medida pela redução da absorbância da solução à 450 nm a cada 5 min, durante 10 min, utilizando um aparelho ELISA (ThermoPlate Reader MN).

A atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento ( $AHC_{50}$ ) foi mensurada de acordo com Zanuzzo et al. (2015). Para tanto, 50 $\mu$ l de cada amostra foi adicionada a 950 $\mu$ l de solução contendo eritrócitos de coelho ( $2 \times 10^8$  cells mL<sup>-1</sup>) e tampão TEA-EGTA-Mg<sup>2+</sup> (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8mM, 2mM de Mg<sup>2+</sup> e 0,1% de gelatina). A análise foi realizada em leitor de microplacas no qual foi mensurado o tempo requerido em segundos para a densidade óptica ser reduzida pela metade (50% de hemólise de eritrócitos de coelho pela via alternativa do complemento). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula:  $AHC_{50} = 1/leitura\ da\ amostra$ .

## **2.7. Indicadores de estresse**

### **2.7.1. Cortisol e Glicemia**

A concentração plasmática do cortisol foi determinada utilizando kit para ensaio imunoenzimático (DRG International, USA; Cortisol ELISA, EIA 1887) e a concentração de glicose plasmática foi analisada pelo método enzimático (Labtest kit, São Paulo, Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes.

## **2.8. Análise Estatística**

Os dados foram testados quanto a homocedasticidade e normalidade segundo os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP) e a diferença entre as médias foi considerada significativa para o valor de  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

Após seis semanas de fornecimento das dietas experimentais, os grupos avaliados não foram diferentes quanto ao ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico ou eficiência alimentar ( $p > 0,05$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desempenho produtivo de *P. mesopotamicus* após seis semanas de suplementação dietética com parede celular de levedura (Par), levedura selenizada (Sel) e levedura selenizada + parede celular de levedura (Sel+Par).

Grupos	GP (g)	CAA	TCE (%)	EA (%)
Ctrl	139,04 ± 15,81	1,59 ± 0,20	0,97 ± 0,08	63,78 ± 7,90
Par	151,88 ± 30,01	1,31 ± 0,14	1,10 ± 0,08	77,05 ± 8,69
Sel	139,30 ± 15,27	1,63 ± 0,15	0,95 ± 0,05	61,75 ± 5,80
Sel+Par	154,19 ± 25,81	1,30 ± 0,18	1,12 ± 0,10	78,61 ± 10,60
<i>F - value</i>	0,381	3,325	0,679	3,242
<i>P - value</i>	0,769	0,060	0,066	0,060

Resultados representados por média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos segundo teste ANOVA seguido pelo teste de Duncan.

Ganho de peso (GP) = Peso final (g) – Peso inicial (g).

Conversão alimentar aparente (CAA) = (Consumo de ração (g)) / (ganho de peso (g))

Taxa de crescimento específico (TCE) = (Ln massa final - Ln massa inicial x 100) / (ndias)

Eficiência alimentar (EA) = (Ganho de peso (g)) / (consumo de alimento (g)) x 100.

Os grupos testados também não tiveram diferença significativa da altura e largura das vilosidades intestinais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Morfometria da região anterior do intestino de *P. mesopotamicus* após seis semanas de suplementação dietética com parede celular de levedura (Par), levedura selenizada (Sel) e levedura selenizada + parede celular de levedura (Sel+Par).

Grupos	Largura dos vilos (µm) <sup>1</sup>	Altura dos vilos (µm) <sup>2</sup>
Ctrl	86,121 ± 21,80	390,15 ± 147,36
Par	79,412 ± 16,39	393,44 ± 93,21
Sel	90,86 ± 22,18	398,58 ± 87,62
Sel+Par	121,54 ± 91,97	431,62 ± 123,55
<i>F - value</i>	1,045	0,209
<i>P - value</i>	0,395	0,889

Resultados representados por média ± desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos segundo teste ANOVA seguido pelo teste de Duncan (p<0,05).

<sup>1</sup>Largura dos vilos: Distância perpendicular à altura da vilosidade

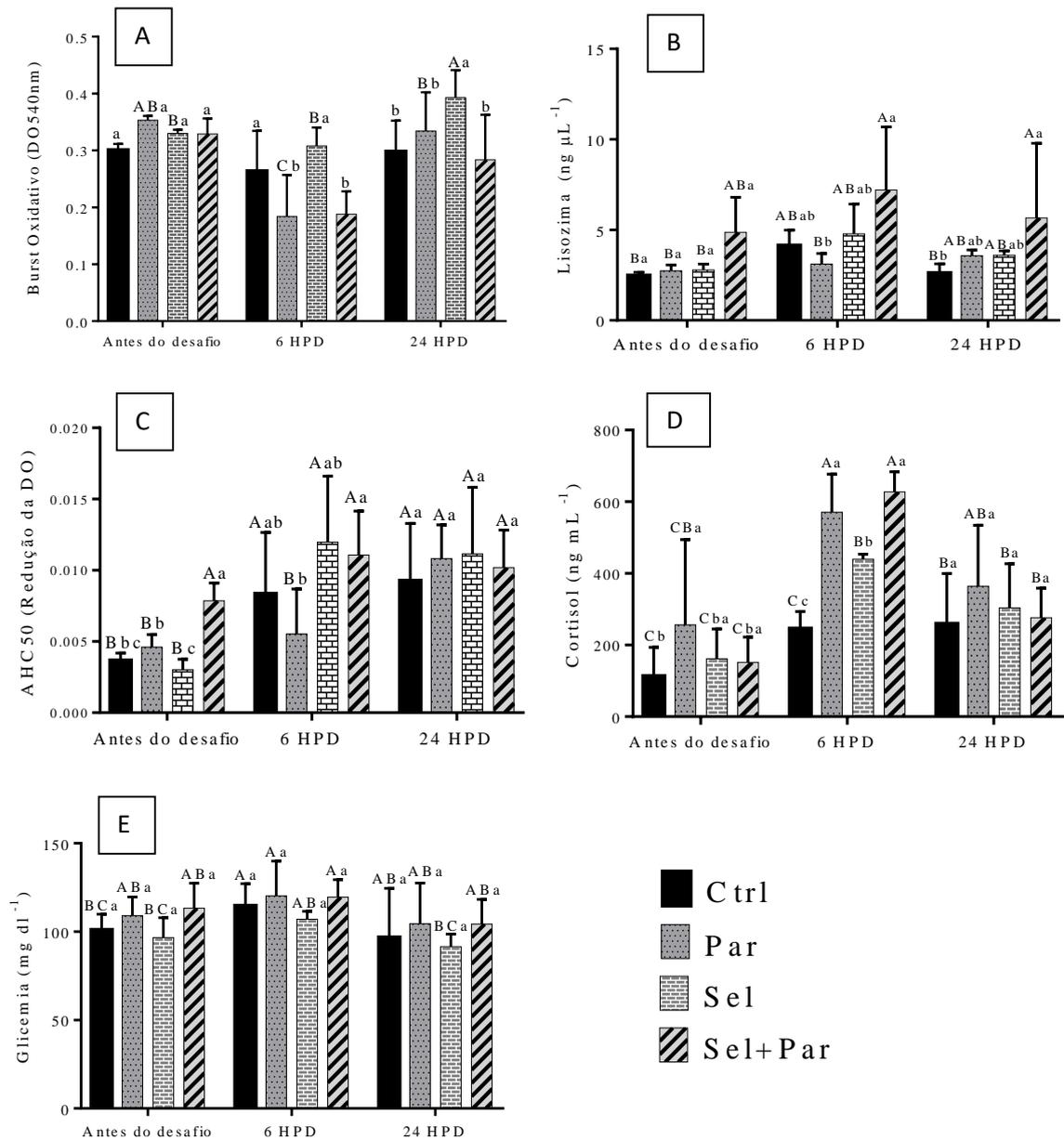
<sup>2</sup>Altura dos vilos: Distância da base da vilosidade até seu ápice.

Todos os grupos mostraram valores semelhantes para *Burst* oxidativo antes do desafio bacteriano (Figura 1, Tabela 4). Os grupos Par e Sel+Par mostraram os menores valores de *burst* oxidativo 6 HPD em relação ao grupo Sel e controle (p< 0,01). Os valores destes grupos retornaram ao nível basal 24 HPD. Por outro lado, os peixes que receberam ração suplementada somente com

levedura selenizada tiveram maior atividade respiratória dos leucócitos 24 HPD em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ).

A  $AHC_{50}$  do grupo Sel+Par foi maior que os demais grupos antes do desafio bacteriano ( $p < 0,01$ ) e se manteve constante em todos os tempos de amostragem. O grupo Par, 06 HPD, mostrou menores valores quando comparado ao grupo Sel+Par ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença entre os diferentes tratamentos 24 HPD.

Assim como aconteceu com a  $AHC_{50}$ , o grupo Par, 06 HPD, também apresentou menor atividade da lisozima quando comparado ao grupo Sel+Par ( $p < 0,05$ ). 24 HPD, o grupo Sel+Par mostrou atividade da lisozima superior ao grupo Ctrl. Não foi observado diferença na glicemia plasmática entre os grupos avaliados. A concentração plasmática de cortisol no grupo Par foi maior que o Ctrl antes do desafio bacteriano. Todos os grupos que receberam as dietas experimentais apresentaram valores maiores que o grupo controle 6 HPD. Neste tempo, o grupo Par apresentou concentração semelhante ao grupo Sel+Par e ambos apresentaram valores maiores que o grupo Sel. Todos os grupos apresentaram concentrações de cortisol plasmático semelhante 24 HPD.



**Tabela 3.** Índices imunológicos de pacus (*P. mesopotamicus*) alimentados com parede celular de levedura (Par), levedura selenizada (Sel) e parede de levedura + levedura selenizada (Sel+Par) por seis semanas.

	<i>Burst</i> oxidativo (DO 540 nm)	Lisozima (ng· $\mu$ L <sup>-1</sup> )	AHC50 (Redução da D.O)	Cortisol (ng·mL <sup>-1</sup> )	Glicemia (ng·dL <sup>-1</sup> )
<b>Antes do desafio</b>					
Ctrl	0,30 ± 0,011 A	2,47 ± 0,18 Ba	0,30 ± 0,011 Bbc	113,23 ± 80,41 Cb	101,01 ± 8,90 Aa
Par	0,35 ± 0,007 ABa	2,72 ± 0,33 Ba	0,35 ± 0,007 Bb	256,45 ± 237,97 CBa	109,11 ± 10,58 Aa
Sel	0,33 ± 0,007 BA	2,77 ± 0,33 Ba	0,33 ± 0,007 Bc	161,88 ± 83,10 Cba	96,66 ± 11,26 Aa
Sel+Par	0,32 ± 0,027 A	4,86 ± 1,94 ABa	0,32 ± 0,027 Aa	151,61 ± 70,56 Cba	113,33 ± 14,13 Aa
<b>6 HPD</b>					
Ctrl	0,26 ± 0,070 A	4,13 ± 0,85 ABab	0,26 ± 0,070 Aab	245,64 ± 48,20 Cc	114,66 ± 12,46 Aa
Par	0,18 ± 0,073 Cb	3,11 ± 0,57 Bb	0,18 ± 0,073 Bb	571,09 ± 106,15 Aa	120,33 ± 19,55 Aa
Sel	0,30 ± 0,081 Ba	4,78 ± 1,64 ABab	0,30 ± 0,032 Aab	439,66 ± 14,09 Bb	107,11 ± 4,48 Aa
Sel+Par	0,18 ± 0,040 B	7,20 ± 3,48 Aa	0,18 ± 0,040 Aa	627,33 ± 56,32 Aa	119,55 ± 9,88 Aa
<b>24 HPE</b>					
Ctrl	0,29 ± 0,054 B	2,61 ± 0,51 Bb	0,29 ± 0,054 Aa	259,08 ± 140,75 Bba	96,77 ± 27,73 Aa
Par	0,33 ± 0,068 Bb	3,57 ± 0,30 ABab	0,33 ± 0,068 Aa	364,12 ± 170,34 ABa	104,55 ± 22,95 Aa
Sel	0,39 ± 0,048 Aa	3,60 ± 0,24 ABab	0,39 ± 0,048 Aa	303,68 ± 123,11 Ba	91,55 ± 7,07 Aa
Sel+Par	0,28 ± 0,079 b	5,65 ± 4,12 Aa	0,28 ± 0,079 Aa	276,48 ± 82,51 Ba	104,25 ± 14,05 Aa
<b><i>P</i> value</b>					
Trat.	<0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,006
Tempo	<0,001	< 0,001	0,004	< 0,001	0,026
Trat. X tempo	<0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	0,098

Letras maiúsculas distintas indicam diferenças entre os tempos de coleta. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre grupos em um mesmo tempo de amostragem.

## 4. DISCUSSÃO

São escassos os trabalhos que avaliam o uso da parede celular de levedura, *S. cerevisiae*, na produção de peixes. Além disso, o efeito do fornecimento deste imunostimulante juntamente com levedura selenizada é completamente desconhecido na aquicultura. Neste estudo, foi investigado o efeito do uso conjunto destes aditivos no desempenho produtivo e na resposta imune do pacu.

A levedura-selenizada é uma importante fonte de selênio orgânico, em particular de selenometionina (SeMet), principal constituinte das selenoproteínas. As selenoproteínas desempenham papéis importantes em vários processos fisiológicos, principalmente no controle, ação e a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e consequente redução do estresse oxidativo (Papp et al., 2007; Förstermann e Sessa, 2012; Klebanoff et al., 2013). A redução do estresse oxidativo reduz a apoptose celular e estimula o aumento dos vilos intestinais e melhor aproveitamento do alimento (Sastre e Pallardó, 2000; Mansour et al., 2017). Além disso, algumas selenoproteínas como a desiodinase e a glutathione peroxidase, regulam a conversão do hormônio tiroxina (T4) em um hormônio metabolicamente ativo, 3,5,3'-triiodotironina (T3) (Kohrle and Gartner, 2009; Guo et al., 2018; Khan et al., 2016,). A concentração elevada de T3 no organismo modula a síntese de hormônio do crescimento (GH) em peixes, aumentando seu crescimento (Khan et al., 2017; Kumar e Singh, 2019).

A parede celular de levedura representa cerca de 15 a 20% do peso seco das células e as principais frações polissacarídicas são  $\beta$ -glucanos e mananoligossacarídeos (MOS) (Shurson, 2018). O MOS pode induzir um melhor desempenho produtivo dos peixes ao atuar como prebiótico, limitando a colonização de patógenos no intestino e, como consequência, levando à um efeito probiótico (Spring et al., 2015; Carbone et al., 2016; Shurson, 2018). Além disso, o MOS promove a melhor integridade da mucosa intestinal, produção de muco e digestão de nutrientes (Mahmoud et al., 2016; Nawaz et al., 2018; Torrecillas et al., 2018).

Os benefícios do selênio orgânico (Salé et al., 2014; Calvo et al., 2016; Knight et al., 2016; Lee et al., 2016; Mansour et al., 2017) ou dos componentes isolados da parede celular de levedura, como  $\beta$ -glucanos (Petit e Wiegertjes, 2016; Vallejos-Vidal et al., 2016; Huynh et al., 2017; Mohan et al., 2018; Navarrete e Tovar-Ramírez, 2014; Zhou et al., 2018) e MOS (Forsatkar et al., 2018; Bai et al., 2017; Rojo-Cebreros et al., 2018) têm sido relatados na produção de peixes. (Kapteyn, Van Den Ende e Klis, 1999; Shurson, 2018). Neste estudo, observamos o crescimento dos peixes de todos os grupos, entretanto, a dosagem sugerida pelo fabricante dos imunoestimulantes, o tempo de suplementação das dietas e as condições experimentais, não foram suficientes para modular alterações na morfometria intestinal ou um melhor aproveitamento do alimento e consequente crescimento. Isto justifica a ausência de diferença significativa no GP, CAA, EA ou TCE entre os grupos avaliados. Li et al. (2016), não observaram diferença no desempenho produtivo de frangos alimentados com dieta suplementada com  $1\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de parede celular de levedura, constatando que esse nível foi muito baixo para as aves. A ausência de efeito no desempenho produtivo para peixes alimentados com MOS também foi observada por Gelibolu et al., (2018) em um experimento com 15 semanas de alimentação, por Dimitroglou et al., (2010) alimentando *Sparus aurata* por nove semanas e por Akter et al., (2016), fornecendo 0,2% e 0,4% de MOS por 12 semanas.

Apesar de não encontrar diferença no desempenho produtivo, os resultados encontrados reforçam o importante papel da levedura selenizada e da parede celular de levedura na modulação da resposta imunológica de peixes, pois, observamos que a administração somente da levedura selenizada ou conjunta dos dois aditivos estimulou a atividade respiratória dos leucócitos, a atividade da lisozima e hemolítica do sistema complemento.

Um dos principais patógenos causadores de mortalidade na criação de pacu é a bactéria gram-negativa *A. hydrophila*, (Farias et al., 2016). Após seis semanas de fornecimento das dietas experimentais, foi inoculado *A. hydrophila* inativa na cavidade celomática do pacu para estimular a resposta imune do organismo à invasão do patógeno como proposto por Rodríguez, Novoa e Figueras et al., (2008) e Zheng et al., (2018). Já foi observado que no início do processo

inflamatório os leucócitos granulares são recrutados por substâncias vasoativas e fatores quimiotáticos para atuar no sítio da inflamação, eliminando patógenos através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a atividade respiratória dos leucócitos (Haslett, 1997). Algumas proteínas, enzimas e substâncias envolvidas na resposta inflamatória e produzidas durante esse processo respiratório, como o óxido nítrico (NO), não estão presentes nos macrófagos em repouso, mas são induzidas por ativação de receptores de reconhecimento padrão em resposta às citocinas e/ou padrões moleculares associados aos patógenos (Xu, et al., 2010; Förstermann e Sessa, 2012).

O desafio com a bactéria intensificou o estresse em todos os grupos experimentais, observado pelo aumento nos níveis de cortisol circulante, um dos principais indicadores da condição de estresse primário (Wendelaar Bonga, 2011). Os grupos Par e Sel+Par apresentaram maiores valores de cortisol 6 HPD. Entretanto, o grupo Sel+Par demonstrou maior capacidade de redução deste hormônio entre 6 HPD e 24 HPD, sugerindo uma metabolização mais rápida que os demais grupos.

Os componentes presentes na composição da parede celular de levedura, como  $\beta$ -glucano, quitina e mananoligossacarídeos (MOS) podem estimular o sistema imunológico dos animais (Sauerwein, Schmitz e Hiss, 2007; Shurson, 2018). Os  $\beta$ -glucanos compõem aproximadamente 60% do peso seco da parede celular, são parte importante da sua estrutura interna (Shurson, 2018; Klis et al., 2006) no intestino, são reconhecidos por receptores da superfície dos macrófagos que, no momento da invasão por patógenos, iniciam uma cascata na modulação da resposta imune levando à rápida migração das células ativas para o sítio da inflamação (Klis et al., 2006; Minami, et al., 2011). Os MOS também têm antígenos reconhecidos pelas células do intestino como padrões moleculares associados à patógenos e desencadeiam uma resposta inflamatória leve e não patogênica (Torrecillas et al. 2014; Selin e Reda, 2015; bu-Elala et al., 2018).

Nosso estudo demonstrou uma redução da atividade respiratória dos leucócitos 06 HPD nos grupos Par e Sel+Par. Isto pode ter acontecido por diversos fatores, sobretudo pela intensa migração de leucócitos da corrente sanguínea para o local da inflamação, reduzindo a concentração de EROs no soro 24 HPD. Esta

migração é um processo natural e normal que é potencializado pelo uso de imunostimulantes (Silva, 2005; Ranzani-Paiva et al., 2008; Dias et al., 2009). Outro motivo pode estar relacionado diretamente à ação imunossupressora do cortisol na atividade respiratória dos leucócitos. Em ambos os casos, o fornecimento de parede celular de levedura está ligado à redução do *burst* oxidativo e a elevação do cortisol, como observado 6 HPD. O grupo Sel, 24 HPD, apresentou maior valor do cortisol em comparação aos demais grupos. O selênio é um mineral que participa diretamente da produção intra e extracelular de EROs (Wise et al., 1993). Por isto, espera-se que ele influencie a atividade respiratória dos leucócitos nos peixes alimentados com ração contendo este aditivo. De fato, a suplementação com selênio na dieta manteve a atividade respiratória dos leucócitos semelhante ao grupo controle 6 HPD e a elevou 24 HPD quando comparado aos demais grupos. O efeito do fornecimento de selênio na atividade respiratória de leucócitos também foi observado por Biller-Takahashi et al., (2015), Takahashi et al., (2016) e Mansour et al., (2017). As respostas para o *burst* oxidativo demonstradas pelo grupo Sel+Par indicam que o fornecimento isolado de parede celular de levedura exerce maior influência neste índice imunológico, uma vez que Sel+Par foi igual a Par, 06 HPD e 24 HPD.

As proteínas do sistema complemento se encontram inativas ou pouco ativadas na corrente sanguínea e tem como principais funções a lise da parede celular de corpos estranhos, a opsonização de patógenos e a quimiotaxia de leucócitos (Secombes, 1996, Rus, Cudrici e Niculescu, 2005). O uso de levedura selenizada com parede celular de levedura promoveu o aumento AHC<sub>50</sub> antes do desafio e pode ter elevado a quimiotaxia de macrófagos nas primeiras horas após o desafio bacteriano. Este fato pode ser confirmado se considerarmos a redução da atividade respiratória dos leucócitos no grupo Sel+Par 6 HPD, devido a migração de células para o sítio da inflamação e pela manutenção de atividade elevada da lisozima após o desafio bacteriano. Neste cenário, a redução do *burst* oxidativo 6 HPD no grupo Par pode ter ocorrido pela imunossupressão ocasionada pelo cortisol. Assim, como neste experimento, Takahashi et al., (2016) não observaram efeito do fornecimento isolado de selênio na AHC<sub>50</sub> em relação ao grupo controle. Acreditamos que o aumento da AHC esteja ligada a ação sinérgica entre os componentes inflamatórios da parede celular de levedura, a função prebiótica do

MOS e a ação da levedura selenizada na resposta antioxidante, que ocasiona bem-estar nos peixes e melhora do sistema imunológico.

Acredita-se que a lisozima sérica de peixes tenha origem leucocitária (Cecchini et al., 2000) e que ela apresenta importância primordial no combate às infecções em peixes, por isto, sua atividade tem sido frequentemente utilizada como indicadora da função imune inespecífica (Vazzana, Parrinello e Cammarata, 2003; Saurabh e Sahoo, 2008). Diferente dos nossos resultados, Lee et al., (2016) observaram maior atividade da lisozima sérica em tilápia-do-Nilo após suplementação dietética com selênio. Assim, como a elevação da AHC<sub>50</sub> antes do desafio, a maior atividade da lisozima 24 HPD no grupo Sel+Par evidenciam o efeito sinérgico do uso dos imunostimulantes testados, indicando maior poder de eliminação de patógenos.

O hormônio cortisol é essencial para os animais, pois garante a produção e distribuição de energia aos tecidos durante situações adversas (Barton e Iwama, 1991; Urbinati, Zanuzzo e Biller-Takahashi, 2014). Entretanto, níveis elevados de cortisol causam efeitos deletérios na saúde dos animais quando perduram por muito tempo (Wendelaar Bonga, 2011; Mommsen, Vijayan e Moon, 1999; Carneiro e Urbinati, 2004; Urbinati, Zanuzzo e Biller-Takahashi, 2014). A elevação dos níveis de cortisol observadas neste experimento mostra o efeito da parede celular de levedura e da levedura selenizada em modular, de diferentes maneiras, a resposta ao estresse nas primeiras horas após o desafio bacteriano. A redução da atividade respiratória dos leucócitos, AHC<sub>50</sub> e atividade da lisozima no grupo Par em relação ao grupo Sel+Par 6 HPD pode ter ocorrido pelo efeito imunossupressor da resposta imune causado pela elevação do cortisol, como mencionado anteriormente (Philip e Vijayan, 2015; Qiang et al., 2018). Entretanto, o curto período de imunossupressão observado, não nos permite afirmar por quais motivos a parede celular de levedura elevou o cortisol plasmático ou se houve desvio energético para outras funções benéficas.

Neste experimento, observamos que o fornecimento de levedura selenizada juntamente com a parede celular de levedura (Sel+Par) atenuou a resposta hormonal, prevenindo uma imunossupressão em situação severa de

estresse, como foi o caso da inoculação bacteriana, mantendo elevada a atividade de lisozima e do complemento.

Assim, os resultados encontrados neste estudo demonstram que a administração conjunta de levedura selenizada e parede celular de levedura, ou o uso isolado de levedura selenizada na dieta do pacu incrementa a resposta imune, evidenciando sua ação imunoestimulante. Embora os resultados encontrados sejam muito promissores, ainda é imprescindível novos estudos que tenham como objetivo conhecer os efeitos da parede celular de levedura nos peixes e o motivo da elevação do cortisol plasmático nestes.

## 5. REFERENCIAS

Abreu, J. S.; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.; Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C., Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n.4, p. 1133-1139, 2009.

Boshra H.; Li, J.; Sunyer, J.O; Recent advances on the complement system of teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, n.2, p.239-262, 2006.

Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A.M.; Mohsin, M., Probiotics and prebiotics associated with Aquaculture: A review. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.2, p. 733-741, 2015.

Akter, M. N.; Sutriana, A.; Talpur, A.D.; Hashim, R.; Dietary supplementation with mannan oligosaccharide influences growth, digestive enzymes, gut morphology, and microbiota in juvenile striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. **Aquaculture International**, v.24, n.1, p.127-144, 2016.

Anderson, D. P.; Siwicki, A. K., Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.: ARTHUR, J.R.: SUBASINGHE, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Phillipines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202, 1995.

Ashouri, S.; Keyvanshokoo, S.; Salati, A.; Johari, A. A.; Pasha-Zanoosi, H., Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 446. n.1, p.25-29, 2015.

Cerezuela, R.; Guardiola F.A.; Meseguer, J.; Esteban, M. A., Increases in immune parameters by inulin and *Bacillus subtilis* dietary administration to gilthead seabream (*Sparus Aurata* L.) did not correlate with disease resistance to *Photobacterium damsela*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1032-1040, 2012.

Dimitroglou, A.; Merrifield, D. L.; Spring, P.; Sweetman, J.; Moate, R.; Davies, S. J., Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v.300, n.1-4, p.182–188, 2010.

Bagni M.; Romano N.; Finioia, MG.; Abelli, L.; Scapigliati, G.; Tiscar, P.G., Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 311-25, 2005.

Barman D.; Nen P.; Mandal S.C.; Kumar V., Immunostimulants for **Aquaculture Health Management. Journal of Marine Science: Research & Development**, v.134, n.3, 2013.

Kordon, A. O.; Attila, K.; Pinchuk, L., Innate Immune Responses in Fish: Antigen Presenting Cells and Professional Phagocytes. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.18, p.1123-1139, 2018.

Cuesta, A.; Rodríguez, A.; Salinas, I.; Meseguer, J.; Esteban, M. A., Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v.22 p.242-251, 2007.

Easona, D. D.; Cannona, J. O. P.; Hairea, R. N.; Rastc, J. P.; Ostrovd, D. A.; Litmana, G. W.; Mechanisms of antigen receptor evolution. **Seminars in Immunology**, v.16, p.215-226, 2004.

Barton, B. A.; Iwama, G. K. Physiological changes in fish from stress in Aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, v.1, n. 0, p. 3-26, 1991.

Ben Hamed, S.; Ranzani-Paiva, M.J.; Tachibana, L.; Dias, D.C.; Ishikawa, C.A; Estaban, M.A., Fish pathogen bacteria: Adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v.80, p.550–562, 2018.

Biller-Takahashi, J.D.; Takahashi, L.S.; Marzocchi-Machado, C.M.; Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C., Disease resistance of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 419 1887) fed with  $\beta$ -glucan. **Brazilian Journal of Biology**, v.74, n.3, p. 698-703, 2014.

Biller-Takahashi, J. D.; Takahashi, L. S.; Mingatto, F. E.; Urbinati, E. C., The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu, *Piaractus mesopotamicus* **Fish & Shellfish Immunology**, v.47, p. 360-367, 2015.

Biller-Takahashi, J. D.; Takahashi, L. S.; Saita, M. V.; Gimbo, R. Y.; Urbinati, E. C., Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology**, v.73, n.2, p.425-429, 2013.

Calvo L.; Toldrá, F.; Aristov, M.v.; López-Bote, C.J.; Rey, A.L., Effect of dietary organic selenium on muscle proteolytic activity and water-holding capacity in pork. **Meat Science**, v.121, p. 1-11, 2016.

Carneiro, P.; Urbinati, E.; Transport stress in matrinxá, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae), at different densities. **Aquaculture International**, v.10, n.3, p.221-229, 2002.

Castro-Escarpulli, G., Figueras, M.J., Aguilera-Arreola, G., Soler, L., Fernandez-Rendon, E.; Aparicio, G. O.; Guarro, J.; Chacon, M. R., Characterisation of *Aeromonas* spp. isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, v. 84, p. 41–49, 2003.

Cecchini, S.; Terova, G.; Caricato, G.; Saroglia, M., Lysozyme activity in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), spawned by broodstocks

fed with vitamin C enriched diets. **Bulletin of the European Association of Fish Pathologists**, v.20, n.3, p.120–124, 2000.

Dawood, M.A.O.; Koshio, S., Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp Aquaculture: A review. **Aquaculture**, v.454, p. 243-251, 2016.

Deivasigamani B.; Subramanian, V., Applications of Immunostimulants in Aquaculture: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied**, v.5, n.9, p.447-453, 2016.

Dias, D.C.; De Stéfani, M.V.; Ferreira, C.M.; França, F.M.; Ranzani-Paiva, M.J.T.; Santos, A.A., Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, *Lithobates catesbeianus*, fed probiotics. **Aquaculture Research**. v. 40, p.1-8, 2009.

Ellis, A.E., Lysozyme assays. In: Stolen J.S.; Fletcher T.C.; Anderson D.P.; Roberson B.S.; Muiswinkel W.B.; (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS 413 publications, p.101-103, 1990.

Farias, T.H.V.; Levy-Pereira, N.; Alves, L.O.; Dias, D.C.; Tachibana, L.; Pilarski, F.; Belo, M.A.A.; Ranzani-Paiva, M.J.T., Probiotic feeding improves the immunity of pacus, *Piaractus mesopotamicus*, during *Aeromonas hydrophila* infection, **Animal Feed Science and Technology**, v.211, p.137–144, 2016.

Förstermann U.; Sessa, W.C., Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **European Heart Journal**, v.33, p. 829-837, 2012.

Garcia, F.; Moraes, F.R. Hematologia e sinais clínicos de *Piaractus mesopotamicus* infectados experimentalmente com *Aeromonas hydrophila*. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 31, n. 1, p.17-21, 2009.

Haslett, C., Granulocyte apoptosis and inflammatory disease. **British Medical Bulletin**, v.53, n.3, p. 669-683, 1997.

Jomori, R. K.; Carneiro, D. J.; Martins, M. I. E. G.; Portella, M. C., Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v.243, p.175-183, 2005.

Kapteyn J.C.; Van Den Ende, H.; Klis, F.M., The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1426, n. 2, p. 373-383, 1999.

Klebanoff, S. J.; Kettle, A. J.; Rosen, H.; Winterbourn, C. C.; Nauseef, W. M., Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v.93, n.2, p.185-198, 2013.

Klis, F.M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W.J., Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, n.3, p.185–202, 2006.

Knight R.; Marlatt V.L.; Baker J.A.; Lo, B.P.; deBruyn, A.M.H.; Elphick, J.R.; Martyniuk, C.J., Dietary selenium disrupts hepatic triglyceride stores and transcriptional networks associated with growth and Notch signaling in juvenile rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, v.180, p.103–114, 2016.

Kumar, N.; Krishnani, K.K.; Kumar P.; Jha, A.K.; Gupta, S.K.; Singh, N.P., Dietary zinc promotes immuno-biochemical plasticity and protects fish against multiple stresses. **Fish & Shellfish Immunology**, v.62, n.17, p.184–194, 2017.

Lazado, C.C.; Caipang, C.M., Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v.39, n.1, p.78-89, 2014.

Le, K.T., Fotedar, R., Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). **Aquaculture**, v. 420-421, p. 57–62, 2014.

Lee S.; Nambi, R.W.; Won, S., Katya, K.; Bai, S.C., Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 464, p. 153–158, 2016.

Li, X.H.; Chen, Y.P.; Cheng, Y.F.; Yang, W.L.; Wen, C.; Zhou, Y.M., Effect of yeast cell wall powder with different particle sizes on the growth performance, serum metabolites, immunity and oxidative status of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 212, p. 81–89, 2016.

Mansour A.T-E.; Goda, A.A.; Omar, E.A.; Khalil, H.S.; Estaban, M.A., Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 68, p. 516-524, 2017.

Meena D.K.; Das, P.; Kumar, S.; Mandal, S.C.; Prusty, A.K.; Singh, S.K., Beta-glucan: An ideal immunostimulant in Aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–57, 2013.

Minami, T.; Tanaka, T.; Takasaki, S.; Kawamura, K.; Hiratsuka, K., In vivo bioluminescence monitoring of defense gene expression in response to treatment with yeast cell wall extract. **Plant Biotechnology**, v.28, n.5, p.481-484, 2011.

Mommsen, T.P.; Vijayan, M.M.; Moon, T.W., Cortisol in teleost: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.

Nawaz, A.; Bakhsh Javid, A.; Irshad, S.; Hoseinifar, S.H.; Xiong, H., The functionality of prebiotics as immunostimulant: Evidences from trials on terrestrial and aquatic animals. **Fish and Shellfish Immunology**, v.76, p. 272-278, 2018.

NRC (National Research Council), **Nutrient requirements of fish**, National Academy Press, Washington DC, USA. 124p, 1993.

Philip, A.M.; Vijayan, M.M., Stress-Immune-Growth Interactions: Cortisol Modulates Suppressors of Cytokine Signaling and JAK/STAT Pathway in Rainbow Trout Liver. **PLoS One**, v. 10, n.6, p. e0129299, 2015.

Ramos, M.A.; Gonçalves, J.F.; Batista, S.; Costas, B.; Pires, MA.; Rema, P.; Ozório, R.O., Growth, immune responses and intestinal morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) supplemented with commercial probiotics. **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n.1, p.19-26, 2015.

Ranzani-Paiva, M.J.T.; Santos, A.A.; Dias, D.C.; Seriani, R.; Egami, M., Hematological and phagocytic response of fat snook, *Centropomus parallelus*, reared in net cages, before and after inoculation with *Sacharomyces cerevisiae*. **Bioikos**, v. 22, n.1, p. 29-35, 2008.

Ringø, E.; Rolf, R.E.; Vecino, J.L.G.; Wadsworth, S.; Song, S.K., Use of immunostimulants and nucleotides in Aquaculture: a review. **Journal of Marine Science: Research & Development**, v.2, n.1, p.1000104, 2012.

Rodríguez, I.; Novoa, B.; Figueras, A., Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 25, n.3, p.239-249, 2008.

Rojo-Cebreros, A. H.; Ibarra-Castro, L.; Martínez-Brown, J. M. Immunostimulation and trained immunity in marine fish larvae. **Fish & Shellfish Immunology**, v.80, p. 15-21, 2018.

Rotruck, J.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.B.; Hafeman, D.G.; Hoekstra, W.G., Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, n.4073, p.588-590, 1973.

Rus, H.; Cudrici, C.; Niculescu, F., The role of the complement system in innate immunity. **Immunology Research**, v.33, n. 2, p.103-112, 2005.

Sado, R. Y.; Bicudo, A. J.; Cyrino, J. E., Growth and hematology of juvenile pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887) fed with increasing levels of vitamin E (DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 1, p. 385-393, 2013.

Saffari, S.; Keyvanshokoo, S.; Zakeri, M.; Johari, S.A.; Pasha-Zanoosi, H., Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n.3, p. 611-617, 2017.

Saleh, R.; Betancor, M.B.; Roo, J.; Montero, D.; Zamorano, M.J.; Izquierdo, M., Selenium levels in early weaning diets for gilthead seabream larvae. **Aquaculture**, v.4, 426–427, p. 256–263, 2014.

Sastre, J.; Pallardó, F.V.; García de la Asunción, J.; Viña, J., Mitochondria, oxidative stress and aging, **Free Radical Research**, v. 32, n. 3, p.189-198, 2000.

Sauerwein, H.; Schmitz, S.; Hiss, S.; Effects of a dietary application of a yeast cell wall extract on innate and acquired immunity, on oxidative status and growth performance in weanling piglets and on the ileal epithelium in fattened pigs. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n 9-10, p. 369–380, 2007.

Saurabh, S.; Sahoo, P.K., Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 3, p. 223-239, 2008.

Schwarz, k.; Foltz, C.M., Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Nutrition Reviews**, v.36, n. 11, p. 338-340, 1978.

Secombes, C.J., The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G.; Nakanishi T., (Eds), **The fish immune system**, London: Academic Press, p. 95-103, 1996.

Shurson, G.C., Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal Feed Science and Technology**, v. 235, p. 60–76, 2018.

Silva, J.R.M.C.; Porto-Neto, L.R.; Borges J.C.S.; Jensch-Junior B.E., Germicide capacity of macrophages in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) at 0°C. **Polar Biology**, v. 28, n.4, p. 326-328, 2005.

Soares, M.P.; Oliveira, F.C.; Cardoso, I.L.; Urbinati, E.C.; Meldau, C.C.; Hisano, H., Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 73, p. 133-140, 2018.

Song, S.K.; Beck, B.R.; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Kim, D.k.; Ringø, E., Prebiotics as immunostimulants in **Aquaculture: a review**. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 40-48, 2014.

Spring, P.; Wenk, C.; Connolly, A.; Kiers, A., A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v.3, n.8, 2015.

Tafalla, C.; Børgwald, J.; Dalmo, R. A., Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. **Fish & Shellfish Immunology**, v.35, n.6, p.1740-1750, 2013.

Takahashi, L.S.; Biller-Takahashi, J.D.; Mansano, C.F.M.; Urbinati, E.C.; Gimbo, R.Y.; Saita, M.V., Long-term organic selenium supplementation overcomes

the trade-off between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v.60, p. 311-317, 2016.

Torrecillas, S.; Rivero-Ramírez, F.; Izquierdo, M.S.; Caballero, M.J.; Makol, A.; Suarez-Bregua, P.; Fernández-Montero, A.; Rotllant, J.; Montero, D., Feeding European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): An effective tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects?. **Fish & Shellfish Immunology**, v.81, p.10-20, 2018.

Urbinati, E.C.; Goncalves, F.D.; Takahashi, L.S., Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) In: Balsisseroto, B.; Gomes, L.C., **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Segunda edição. Santa Maria: Editora UFSM, v. único, p.205-244, 2010.

Urbinati, E.C.; Zanuzzo, F.S.; Biller-Takahashi, J.D., Estresse e sistema imune em peixes. In: Baldisserotto, B.; Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C (Ed.). **Biologia e fisiologia de peixes neotropicais de água doce**, Jaboticabal: Editora FUNEP, p.87-105, 2014.

Valladão, G.M.R.; Gallani, S.U.; Pilarski, F., South America fish for continental **Aquaculture. Reviews in Aquaculture**, v.10, n. 2, p.351-369, 2018.

Van der Vaart, M.; Spaank, H, P.; Meijer, A. H.; Pathogen Recognition and Activation of the Innate Immune Response in Zebrafish. **Advances in Hematology**, v.2, p. 1-19, 2012.

Vazzana, M.; Parrinello, D.; Cammarata, M.; Chemiluminescence response of  $\beta$  glucan stimulated leukocytes isolated from different tissues and peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 14, n. 5, p. 423–434, 2003.

Vetvicka, V.; Vannucci, L.; Sima, P., The Effects of  $\beta$ -Glucan on Fish Immunity. **North American Journal of Medical Science**, v.5, n.10, p. 580-588, 2013.

Wendelaar Bonga, S. E., Hormone Response to Stress. In: Farrel, A. P.; Cech, J. J.; Richards, J. G.; Stevens, E. D., (Ed.). **Encyclopedia of Fish**

**Physiology: from genome to environment**, Editora Elsevier Academic Press Inc, UK, p. 1515-1523, 2011.

Whittington, R.; Lim, C.; Klesius, P.H., Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 248, n. 1-4, p. 217-225, 2005.

Wise, D.J.; Tomasso, J.R.; Schewedler, T.E.; Blazer, V.S.; Gatlin, D.M.III, Effect of vitamin E on the immune response of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 5, n. 3, p. 183-188, 1993.

Xu, H.; Ai, Q.; Mai, K.; Xu, W.; Wang, J.; Ma, H.; Zhang, W.; Wang, X.; Liufu, Z., Effects of dietary arachidonic acid on growth performance, survival, immune response and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. **Aquaculture**. v. 307, n.1-2, p. 75–82, 2010.

Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C.; Rise, M.L.; Hall, J.R.; Nash, G.W.; Gamperl, A.K., *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**. v. 435, p.1-9, 2015.

Zheng, L.; Feng, L.; Jiang, W-D.; Wu, P.; Tang, L.; Kuang, S-Y.; Zeng, Y-Y.; Zhou, X-Q.; Liu, Y., Selenium deficiency impaired immune function of the immune organs in young grass carp. (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 77, p. 53-70, 2018

### **CAPÍTULO 3**

**Efeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, parede celular de levedura e levedura selenizada no desempenho produtivo e resposta imunológica de tilápia-do-Nilo**

## **Efeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, parede celular de levedura e levedura selenizada no desempenho produtivo e resposta imunológica de tilápia-do-Nilo**

### **RESUMO**

A estrutura celular da levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, apresenta importantes compostos imunoestimulantes utilizados na aquicultura. Entretanto, os mecanismos de atuação e o efeito da interação destes compostos ainda são desconhecidos. Neste estudo buscou-se compreender o efeito do uso de levedura selenizada (SEL), parede celular de levedura (PAR) e levedura viva, *S. cerevisiae* (LEV). Para tanto, foram utilizados 288 juvenis de tilápia-do-Nilo ( $20,6 \pm 3,8\text{g}$ ) distribuídos em seis grupos experimentais, de acordo com a suplementação dietética a seguir: CTRL (Controle), SEL ( $0,6\text{g kg}^{-1}$  levedura selenizada), PAR ( $1,0\text{g kg}^{-1}$  parede celular de levedura), LEV ( $1\text{g kg}^{-1}$  levedura *S. cerevisiae*), SEL+LEV ( $0,6\text{g kg}^{-1}$  levedura selenizada +  $1\text{g kg}^{-1}$  levedura) e SEL+PAR ( $0,6\text{g kg}^{-1}$  levedura selenizada +  $1,0\text{g kg}^{-1}$  parede celular de levedura). Durante o período experimental os animais foram avaliados quanto ao desempenho produtivo e a resposta imunológica. Os grupos LEV e SEL+LEV apresentaram melhores índices de desempenho produtivo e maior altura dos vilos intestinais. A atividade respiratória dos leucócitos foi maior nos grupos PAR e SEL+PAR com 60 dias de alimentação, enquanto que com 90 dias, os grupos LEV e SEL+LEV tiveram maior atividade. Observamos que os peixes suplementados com dieta contendo SEL+LEV e SEL+PAR tiveram os maiores valores de atividade da lisozima, que os grupos LEV e SEL+LEV apresentaram maior atividade hemolítica do sistema complemento, que perdurou por mais tempo e que os grupos PAR e SEL+PAR apresentaram os maiores valores de cortisol sérico. Concluímos que o uso em conjunto dos imunoestimulantes testados incrementam o sistema imunológico inato da tilápia.

**Palavras-chave:** Imunoestimulantes, parede celular de levedura, levedura selenizada

# 1. INTRODUÇÃO

O uso de antimicrobianos como medida preventiva à ação de patógenos e como promotor de crescimento não é mais uma alternativa aceitável e por isto a utilização de imunostimulantes tem sido amplamente recomendada (Cruz et al., 2012; Barman et al., 2013; Navarrete e Tovar-Ramírez 2014; Carbone e Gaggio, 2016; Bahi et al., 2017; Hoseinifar et al., 2018).

Os imunostimulantes atuam sobre diversos mecanismos no organismo dos animais e resultam na ativação rápida dos mecanismos de defesa inata, promovendo resistência à ação de patógenos, redução do estresse e conseqüentemente, a melhora do desempenho produtivo (Barman et al., 2013; Tafalla et al., 2013; Song et al., 2014; Deivasigamani e Subramanian 2016; Ringø et al., 2012; Vallejos-Vidal et al., 2016).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um probiótico que atua no intestino, competindo com patógenos por nutrientes e sítios de adesão, produzindo compostos antimicrobianos, excretando enzimas úteis à digestão e na manutenção da integridade intestinal (Ringø et al., 2010; Spring et al., 2015; Dawood et al., 2016; Carbone et al., 2016; Torrecillas et al., 2018). A parede celular da levedura contém dois dos principais suplementos funcionais utilizados na aquicultura, o mananoligossacarídeo (MOS) e o  $\beta$ -glucano (Bagni et al., 2005, Whittington et al., 2005; Meena et al., 2013, Vetvicka et al., 2013; Soares et al., 2018).

O selênio é um micronutriente traço essencial e fundamental na manutenção das condições fisiológicas normais de animais, incluindo peixes (NRC, 1993). A levedura acumula naturalmente o selênio inorgânico do meio de cultura e o converte para forma orgânica (selenometionina) ao compor suas estruturas celulares (levedura selenizada) (Kieliszek et al., 2015). A selenometionina tem papel fundamental na atividade antioxidante, no crescimento, na expressão de enzimas e proteínas do sistema imune e na manutenção das funções efetoras leucocitárias, incluindo aderência, migração e fagocitose (Lin, 2014; Biller-Takahashi, 2015; Kumar et al. 2018).

Tanto a levedura íntegra, a parede celular da levedura como a levedura selenizada atuam de diferentes maneiras na modulação do sistema imunológico e

na redução do estresse oxidativo em peixes. Em estudos anteriores observamos que a utilização da parede celular de levedura e levedura selenizada podem modular a resposta imunológica e o estresse do pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Assim, este experimento, teve como objetivo avaliar o efeito da utilização conjunta da levedura íntegra, parede celular de levedura e levedura selenizada, como suplemento alimentar para tilápia-do-Nilo para compreender melhor seus mecanismos de atuação, tanto na saúde quanto no desempenho produtivo dos peixes.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Dieta

A fonte de levedura viva (*S. cerevisiae*;  $2 \times 10^9$  UFC  $g^{-1}$ ), a parede celular de levedura (*S. cerevisiae*) e a levedura selenizada foram obtidas de empresa, com os nomes comerciais de Procreatin 7®, Safmannam®, Selsaf 3000® (Phileo - Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, França). Seis dietas isoproteicas e isonergéticas foram formuladas com suplementação vitamínica e mineral, atendendo as exigências para tilápia em crescimento (NRC, 1993). Uma dieta extrudada foi misturada mecanicamente com 2% de óleo vegetal e suplementada com um dos seguintes aditivos: Levedura viva  $1g\ kg^{-1}$  (LEV); Parede celular de levedura  $1g\ kg^{-1}$  (PAR); Levedura selenizada  $0,6mg\ kg^{-1}$  (SEL); Levedura selenizada  $0,6mg$  + Parede de levedura  $1g\ kg^{-1}$  (SEL+PAR); Levedura selenizada  $1g\ kg^{-1}$  + Levedura viva  $1g\ kg^{-1}$  (SEL + LEV). O grupo controle (CTRL) teve adição de 2% de óleo vegetal sem imunostimulantes (Tabela 1).

**Tabela 1.** Composição percentual da dieta básica experimental.

Ingredientes %	Ctrl	Par	Sel	Lev	Sel+Par	Sel+Lev
Farinha de vísceras	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Farinha de peixe	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Farinha de soja	35,8	35,8	35,8	35,8	35,8	35,8
Milho	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0
Farelo de trigo	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Óleo de soja	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Quirera de arroz (Arroz)	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0	9,0
Farelo de arroz	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Farelo de algodão	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
NaCl	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Fosfato de cálcico	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6
Calcário	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Antifúngico (filax)	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
BHT, antioxidante	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Supl. vitamínico e mineral <sup>1</sup>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
L- Lisina HCL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-Metionina	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
TOTAL	100	100	100	100	100	100
Óleo de Soja	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Selsaf 3000® <sup>2</sup>	0,0	0,0	0,06	0,00	0,06	0,06
Procreatin7® <sup>3</sup>	0,0	0,0	0,00	0,10	0,00	0,10
Safmannam® <sup>4</sup>	0,0	0,10	0,00	0,00	0,10	0,0
<b>Composição analisada</b>						
Matéria Seca (%)	90,66	90,76	90,72	90,75	91,32	91,32
Proteína Bruta (%)	30	30,02	30,03	30,04	30,35	30,37
Extrato Etéreo (%)	7,01	7,01	7,01	7,01	7,02	7,02
Fibra Bruta (%)	4,62	4,62	4,62	4,62	4,62	4,62
Matéria Mineral (%)	6,52	6,52	6,52	6,52	6,56	6,56
Extrato não nitrogenado <sup>5</sup> (%)	37,38	37,45	37,40	37,43	37,64	37,61
Energia bruta (Kcal/kg)	4077	4082,1	4079,8	4081,5	4110,3	4109,7

<sup>1</sup>Agromix Nutrição Animal. Jaboticabal-SP. Níveis de garantia kg do produto. Ácido Fólico 1200,00 mg/kg; Ácido Pantotênico 10.000,00 mg/kg; Biotina 200,00 mg/kg; Cobalto 80,00 mg/kg; Cobre 3.500,00 mg/kg; Colina 100,00 g/kg; Iodo 160,00 mg/kg; Inositol 25,00 g/kg; Manganês 10.000,00 mg/kg; Selênio 100,00 mg/kg; Vitamina A 2.400.000,00 UI/kg; Vitamina B1 4.000,00 mg/kg; Vitamina B2 4.000,00 mg/kg; Vitamina B12 8.000,00 mcg/kg; Vitamina C 60,00 g/kg; Vitamina B2 4.000,00 mg/kg; Vitamina B6 3.500,00 mg/kg; Vitamina D3 600.000,00 UI/kg; Vitamina E 30.000,00 UI/kg; Vitamina K3 3.000,00 mg/kg; Zinco 24,00 mg/kg; Ácido Nicotínico 20,00 g/kg; Ferro 20,00 g/kg;

<sup>2</sup>Levedura Selênizada.

<sup>3</sup>Levedura viva (*S. cerevisiae*)<sup>4</sup>Parede celular de levedura (*S. cerevisiae*).<sup>5</sup>ENN = MS-(PB+EE+MM+FB).

## 2.2. Condições Experimentais

Foram utilizadas 288 tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), masculinizadas, com peso médio de  $20,6 \pm 3,8$ g, provenientes de piscicultura comercial e oriundas da mesma desova, distribuídas em 24 aquários com volume de 300L providos de renovação de água constante e oxigenação complementar. Os peixes foram alimentados com as dietas experimentais, quatro vezes ao dia, com 3 a 5% do peso vivo (Furuya 2010; NRC, 1993) durante 90 dias. O experimento foi realizado com quatro repetições representadas por um aquário contendo 12 peixes. A temperatura e o oxigênio da água foram monitorados diariamente e o pH, amônia e nitrito, a cada 15 dias. Os valores das variáveis se mantiveram adequados à criação da tilápia-do-Nilo (Boyd, 1990; Devi et al., 2017). A temperatura média foi de  $26,1^\circ \pm 1^\circ$ C, o oxigênio dissolvido de  $5,2 \pm 0,7$  mg L<sup>-1</sup>, pH de  $7,1 \pm 0,1$ , a amônia e nitrito de  $0,38 \pm 0,14$  mg L<sup>-1</sup> e  $0,02 \pm 0,06$  mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

## 2.3. Desempenho produtivo

O desempenho produtivo foi avaliado a cada 30 dias conforme os cálculos: Ganho de peso (GP) = Peso final (g) – Peso inicial (g); Conversão alimentar aparente (CAA) = (Consumo de ração (g))/(ganho de peso (g)); Taxa de crescimento específico (TCE) =  $(\ln \text{ massa final} - \ln \text{ massa inicial} \times 100)/(\text{ndias})$  e Taxa de eficiência protéica (TEP) =  $(\text{Ganho de peso (g)})/(\text{consumo de alimento} \times \text{proteína bruta na dieta (g)}) \times 100$ .

## 2.4. Morfometria Intestinal

Após 30, 60 e 90 dias de início do fornecimento da dieta experimental, o segmento anterior do intestino, localizado dois centímetros a partir do estômago, foi coletado de oito peixes por tratamento para análise da morfometria intestinal.

Cada fragmento do intestino foi fixado em solução de formalina tamponada (10%) por 24 horas e desidratados em série crescente de álcool, clarificados com xilol, incluídos em parafina a 60°C, seccionados com 5µm de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e Periodic acid-Schiff (PAS). As lâminas foram montadas em resina sintética, analisadas e fotografadas em microscópio óptico Nikon E200 contendo sistema de captura de imagem Motic 5.0 para análise da altura e largura das vilosidades e contagem de células calciformes segundo Cerezuela et al., (2012) e Dimitroglou et al., (2010).

## **2.5. Desafio com *Aeromonas hydrophila***

A bactéria Gram-negativa, *Aeromonas hydrophila*, utilizada no desafio foi previamente isolada de peixes naturalmente infectados e identificada pelo sequenciamento do gene 16sRNA (GenBank: MH591949.1). A cepa foi inativada em banho-Maria à 56°C por 30 min e inoculada na cavidade celomática dos peixes na dose previamente determinada pela DL<sub>50</sub> ( $3,25 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>; 1% p/v) para avaliar a ativação do sistema imune da tilápia após 60 e 90 dias do fornecimento das dietas experimentais. Antes, 8 e 24 horas após o desafio bacteriano (HPD), 10 peixes por grupo foram anestesiados com solução de benzocaína (0,1g L<sup>-1</sup>) e tiveram o sangue colhido por punção do vaso caudal para realização das análises imunológicas.

## **2.6. Atividade respiratória dos leucócitos (*Burst* oxidativo), Atividade sérica da lisozima e Atividade hemolítica do sistema complemento (Via alternativa)**

A atividade respiratória dos leucócitos (*Burst* oxidativo) foi mensurada a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) seguindo o protocolo de Anderson e Siwicki (1995) modificado por Biller-Takahashi et al., (2013). Para tanto, 0,1mL de sangue foi adicionado a um volume igual de tampão azul de nitrotetrazólio (NBT; Sigma-Aldrich, MO, USA) (0,2%) por 30 min a 25°C. Após a incubação, 50µL da solução foi adicionada à 1mL de N,N-dimetilformamida (Sigma-

Aldrich, MO, USA), e em seguida centrifugada a 3.000 G por 5 min. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (Unico, Feixe série 2100) a 540nm de absorvância.

Para as demais análises imunológicas, parte do sangue foi mantida à temperatura ambiente por quatro horas para separação do soro utilizado para determinação de concentração de lisozima e atividade hemolítica do sistema complemento.

A concentração da lisozima foi determinada segundo metodologia proposta por Ellis (1990), modificada por Abreu (2009) e Biller-Takahashi et al (2014). Brevemente, 125µL de uma solução contendo *Micrococcus lysodeikticus* (0,2 mg mL<sup>-1</sup>) foi misturada com 50µL de soro e incubada por 1 hora em leitor de microplacas e medida pela redução da absorvância da solução à 450nm a cada cinco minutos, durante dez minutos, utilizando um aparelho ELISA (ThermoPlate Reader MN).

A atividade hemolítica das proteínas do sistema complemento (ACH<sub>50</sub>; Via alternativa) foi mensurada de acordo com Zanuzzo et al., (2015). Para tanto, 50µl de cada amostra foi adicionada à 950µl de solução contendo eritrócitos de coelho (2·x10<sup>8</sup> células por mL) e tampão TEA-EGTA-Mg<sup>2+</sup> (ácido trietanolamina etilenoglicol tetracético, 8mM, 2mM de Mg<sup>2+</sup> e 0,1% de gelatina). A análise foi realizada em leitor de microplacas para avaliação do tempo requerido em segundos para a densidade óptica ser reduzida pela metade (50% de hemólise de eritrócitos de coelho pela via alternativa do complemento). A atividade foi transformada pela seguinte fórmula:  $ACH_{50} = 1/leitura\ da\ amostra$  de acordo com Zanuzzo et al., (2017).

## 2.7. Cortisol e Glicemia

A concentração plasmática do cortisol foi determinada através de kit de ensaio imunoenzimático (DRG International, USA; Cortisol ELISA, EIA 1887) e a concentração de glicose plasmática foi analisada pelo método enzimático (Labtest kit São Paulo, Brasil) seguindo as recomendações dos fabricantes.

O estudo foi realizado de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal (Protocolo 010995/18).

## **2.8. Análise Estatística**

Os dados foram testados quanto a homocedasticidade e normalidade segundo os testes de Levene e Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA em DIC com 18 tratamentos em esquema fatorial) seguida pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos em média±desvio padrão (DP) e a diferença entre as médias foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

Observamos diferenças no desempenho produtivo dos peixes a partir de 60 dias de suplementação dietética. Neste tempo, os grupos LEV e SEL+LEV apresentaram melhores índices de GP, CAA, TCE e TEP ( $p < 0,05$ ). Com 90 dias de experimento o grupo PAR apresentou médias de GP, CAA e TCE semelhantes ao CTRL (Tabela 2) enquanto LEV e SEL+LEV mostraram os melhores valores médios seguidos pelo grupo SEL ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 2.** Ganho de peso (CAA), conversão alimentar aparente (CAA), taxa de crescimento específico (TCE) e taxa de eficiência proteica (TEP) de tilápia-do-Nilo alimentadas com dietas contendo levedura selenizada (SEL), levedura (LEV), parede celular de levedura (PAR), selênio com levedura (SEL+LEV) e selênio com parede celular de levedura (SEL+PAR) após 30, 60 e 90 dias de fornecimento das dietas experimentais.

Grupos	Desempenho produtivo			
	GP (g)	CAA	TCE (%)	TEP (%)
<b>30 dias</b>				
CTRL	45,2 ± 11,0	1,78 ± 0,28	1,71 ± 0,02	2,36 ± 0,05
SEL	49,2 ± 12,9	1,82 ± 0,38	1,80 ± 0,03	2,36 ± 0,08
LEV	48,0 ± 17,4	1,81 ± 0,31	1,77 ± 0,03	2,44 ± 0,05
PAR	45,8 ± 14,3	1,85 ± 0,35	1,73 ± 0,03	2,45 ± 0,06
SEL+LEV	46,9 ± 19,0	1,79 ± 0,29	1,75 ± 0,02	2,44 ± 0,06
SEL+PAR	48,3 ± 16,5	1,78 ± 0,28	1,78 ± 0,02	2,44 ± 0,05
<b>60 dias</b>				
CTRL	98,7 ± 17,2 c	2,68 ± 0,10 c	1,29 ± 0,06 b	1,95 ± 0,08 c
SEL	106,4 ± 23,1 bc	2,59 ± 0,12 bc	1,33 ± 0,04 b	2,09 ± 0,02 b
LEV	126,1 ± 16,3 a	2,35 ± 0,11 a	1,44 ± 0,04 a	2,18 ± 0,03 a
PAR	92,9 ± 23,1 c	2,61 ± 0,12 c	1,25 ± 0,06 b	1,91 ± 0,08 c
SEL+LEV	130,3 ± 27,0 a	2,35 ± 0,13 a	1,46 ± 0,03 a	2,17 ± 0,03 a
SEL+PAR	101,5 ± 19,7 bc	2,59 ± 0,13 bc	1,31 ± 0,03 b	2,11 ± 0,02 b
<b>90 dias</b>				
CTRL	139,7 ± 24,5 c	2,54 ± 0,26 c	1,00 ± 0,02 c	2,12 ± 0,10 cb
SEL	156,0 ± 33,2 b	2,58 ± 0,26 b	1,05 ± 0,02 b	2,21 ± 0,05 b
LEV	174,7 ± 31,0 a	2,39 ± 0,24 ab	1,10 ± 0,03 ab	2,29 ± 0,06 a
PAR	123,5 ± 32,1 c	2,69 ± 0,21 c	0,95 ± 0,04 c	2,08 ± 0,09 c
SEL+LEV	188,9 ± 32,0 a	2,22 ± 0,25 a	1,13 ± 0,03 a	2,33 ± 0,06 a
SEL+PAR	142,6 ± 24,6 bc	2,59 ± 0,26 b	1,02 ± 0,03 b	2,21 ± 0,60 b
<b>P value</b>				
Trat	0,01	0,01	0,01	0,01
Tempo	< 0,01	< 0,01	0,516	0,05
Trat x tempo	< 0,01	< 0,01	0,026	0,03

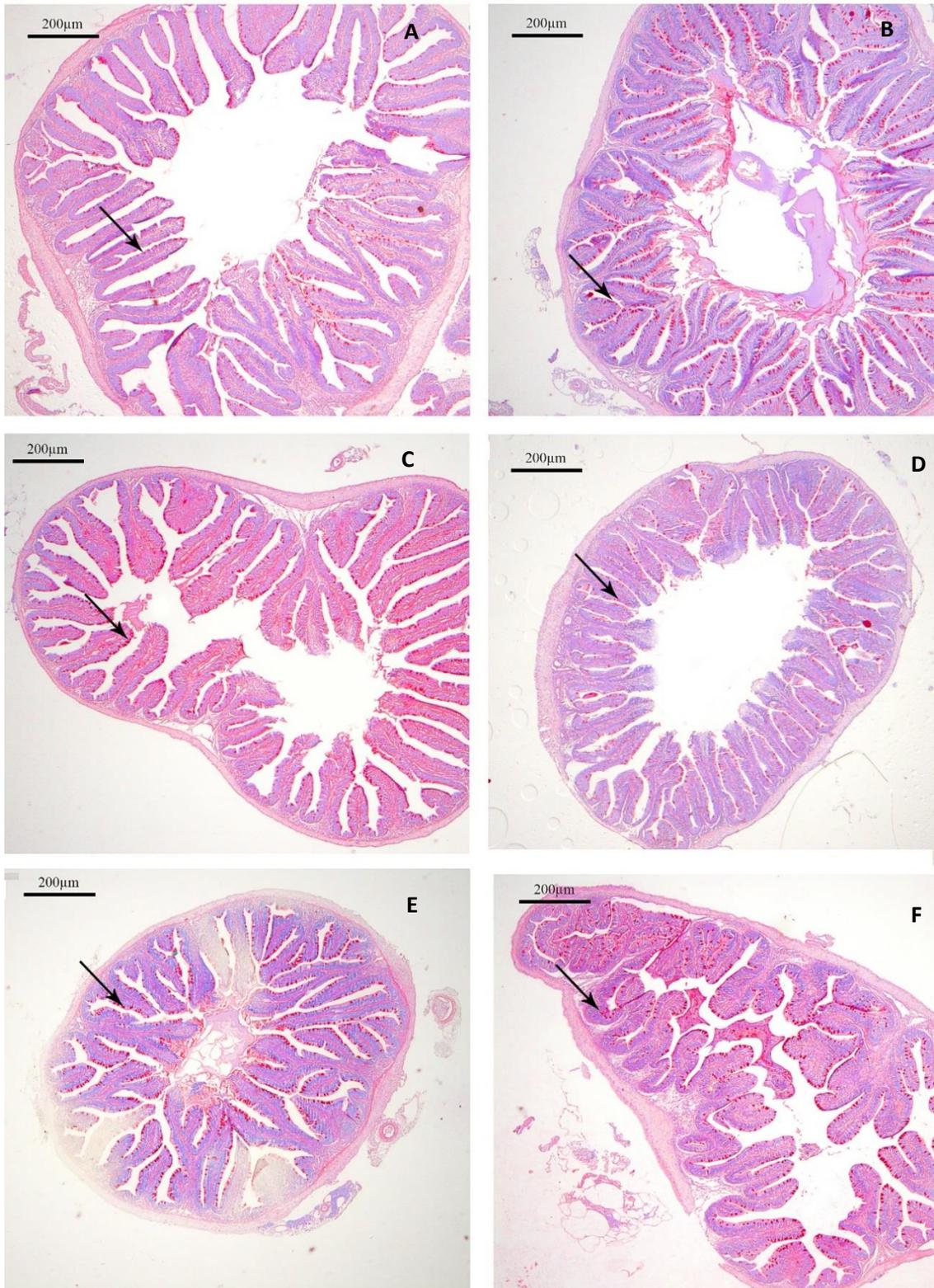
Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo grupo de amostragens ( $p < 0,05$ ). Valores são representados por médias ± desvio padrão.

Após 30 dias de suplementação alimentar com os aditivos, a altura média das vilosidades intestinais do grupo SEL foi significativamente maior do que nos grupos PAR e SEL+PAR. Após 60 dias, os grupos SEL, LEV, SEL+LEV e SEL+PAR tiveram médias maiores que o grupo CTRL. Neste tempo, os grupos CTRL e PAR tiveram médias iguais. Após 90 dias, o grupo SEL teve altura média dos vilos igual ao grupo SEL+LEV e superior aos demais grupos (Figura 1, Tabela 3). Não houve diferença na largura média das vilosidades e nem na quantidade média de células calciformes entre os grupos avaliados.

**Tabela 3.** Altura média das vilosidades do intestino anterior de tilápia-do-Nilo após 30, 60 e 90 dias de suplementação dietética com levedura selenizada (SEL), levedura íntegra (LEV), parede celular de levedura (PAR), levedura selenizada + levedura íntegra (SEL+LEV) e levedura selenizada + parede celular de levedura (SEL+PAR).

Altura média das vilosidades ( $\mu\text{m}$ )									
	30 dias			60 dias			90 dias		
CTRL	198,43	$\pm$ 126,75	Ab	199,32	$\pm$ 65,02	d	201,76	$\pm$ 58,3	c
SEL	219,60	$\pm$ 99,41	A	284,35	$\pm$ 62,00	ab	322,63	$\pm$ 82,8	a
LEV	193,45	$\pm$ 51,63	Ab	258,00	$\pm$ 136,67	bc	246,89	$\pm$ 67,2	bc
PAR	170,45	$\pm$ 49,50	B	230,82	$\pm$ 94,26	dc	217,87	$\pm$ 52,7	bc
SEL+LEV	190,81	$\pm$ 89,86	Ab	289,89	$\pm$ 97,09	ae	283,30	$\pm$ 71,7	ad
SEL+PAR	163,35	$\pm$ 29,25	B	258,78	$\pm$ 61,97	bce	247,03	$\pm$ 83,4	bcd
<i>F value</i>	4,221			10,53			8,88		
<i>P value</i>	0,001			<0,01			<0,01		

Resultados representados por média  $\pm$  desvio padrão. Letras distintas mostram diferenças entre linhas em um mesmo tempo de amostragem segundo teste ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
 Altura dos vilos: Distancia da base da vilosidade até seu ápice.

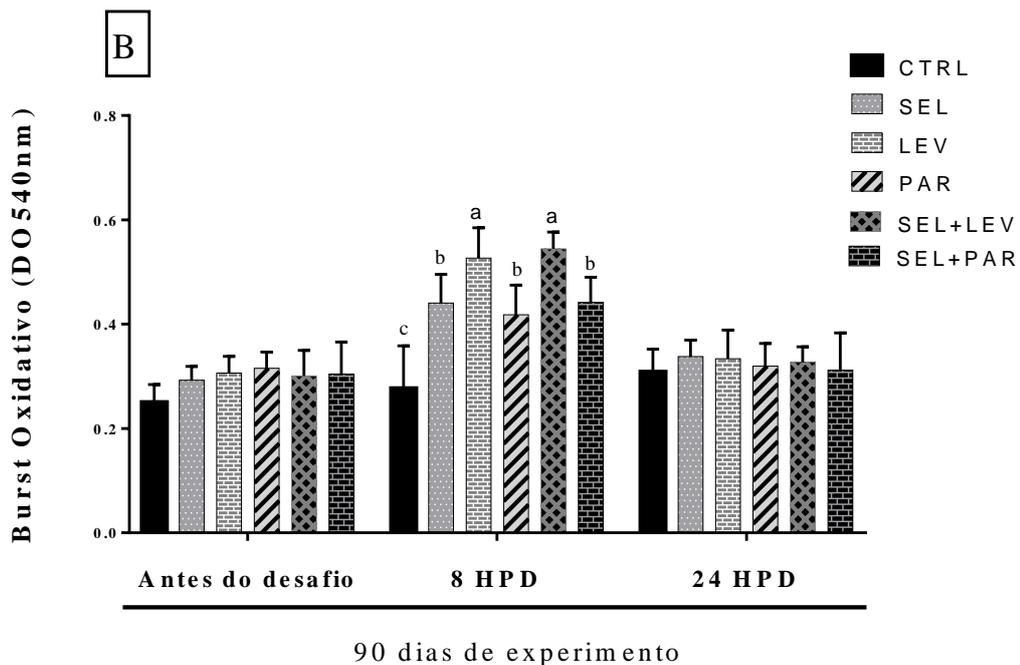
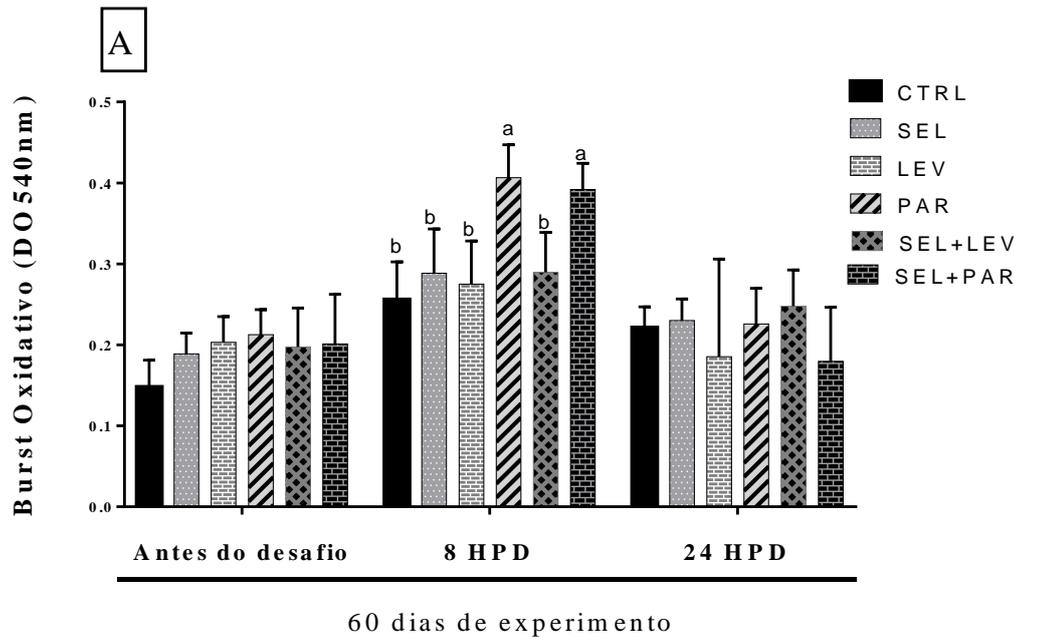


**Figura 1.** Região anterior do intestino de tilápia-do-Nilo alimentada com dieta suplementada com aditivos e com dieta basal durante 90 dias. Grupo controle (A), levedura selenizada (B), levedura (C), parede celular de levedura (D), levedura selenizada + parede celular de levedura (E) e levedura selenizada + levedura (F). Setas indicam células caliciformes na borda dos vilos. Coloração com PAS.

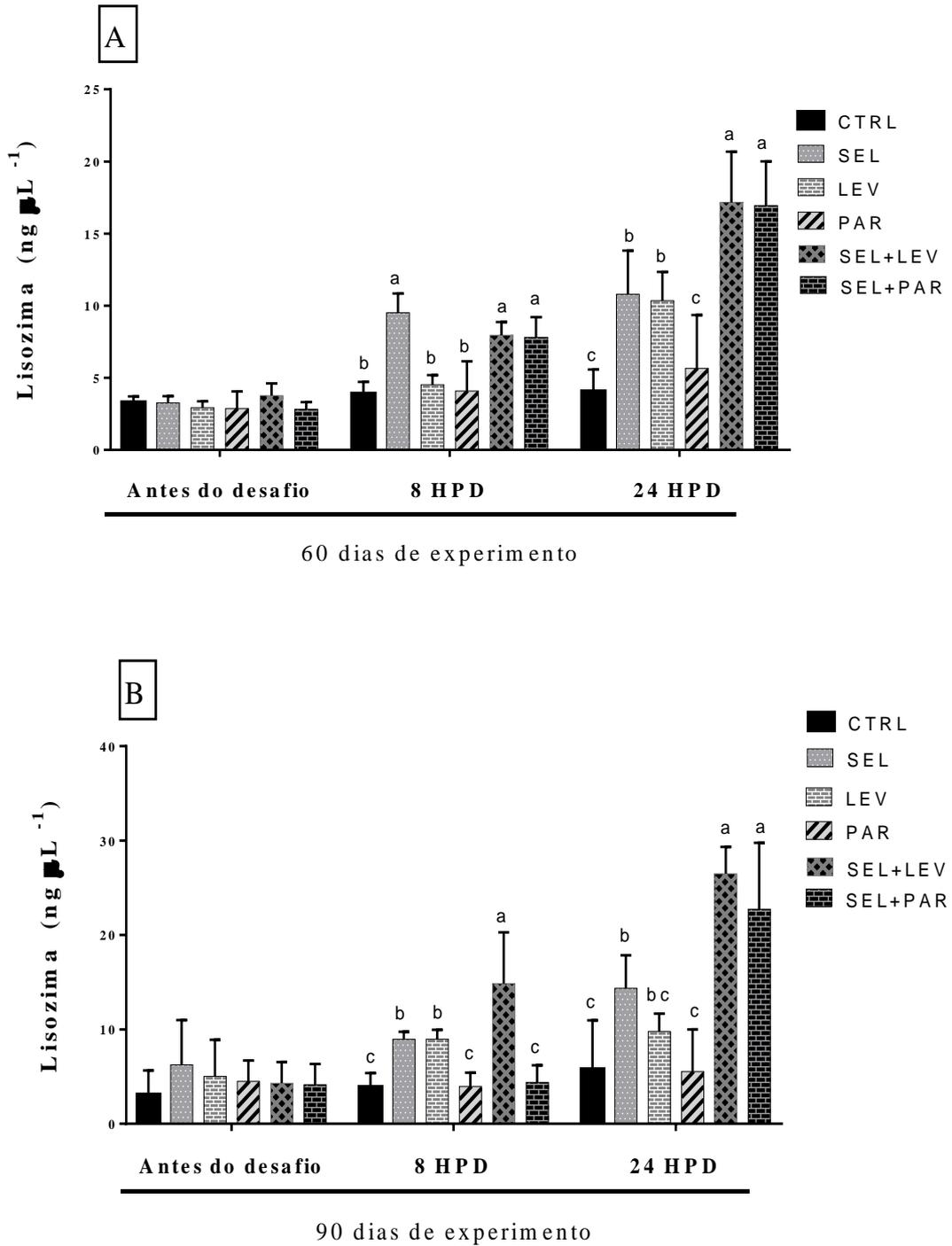
A atividade respiratória dos leucócitos foi significativamente maior nos grupos PAR e SEL+PAR 8 HPD após 60 dias de alimentação ( $p < 0,05$ ). Após 90 dias, os grupos alimentados com ração contendo LEV e SEL+LEV mostraram maior atividade, seguidos por SEL, PAR e SEL+PAR que apresentaram resposta superior ao CTRL (Figura 2).

Após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, a atividade da lisozima foi maior nos grupos SEL, SEL+LEV e SEL+PAR 8 HPD ( $p < 0,05$ ). Os grupos SEL+LEV e SEL+PAR mantiveram valores superiores 24 HPD, seguidos pelos grupos SEL e LEV ( $p < 0,05$ ). Neste tempo de amostragem, os grupos CTRL e PAR apresentaram valores semelhantes ( $p < 0,05$ ). Após 90 dias de alimentação, o grupo alimentado com ração contendo SEL+LEV mostrou valores superiores aos demais, seguido pelos grupos SEL e LEV, 8 HPD ( $p < 0,05$ ). Após 24 horas do desafio bacteriano, os grupos SEL+LEV e SEL+PAR apresentaram maior atividade da lisozima, seguidos pelo grupo SEL ( $p < 0,05$ ) (Figura 3). A atividade hemolítica do complemento no grupo SEL foi semelhante ao grupo CTRL em todas as amostragens. Após 60 dias de alimentação com as dietas experimentais, os grupos LEV, SEL+LEV e SEL+PAR mostraram maior atividade 8 HPD, enquanto os grupos LEV e SEL+LEV mantiveram os maiores níveis 24 HPD. Após 90 dias de alimentação, os grupos LEV e SEL+LEV também apresentaram maior atividade que os demais tratamentos 8 HPD e os grupos LEV, PAR, SEL+LEV e SEL+PAR apresentaram maior atividade que o grupo CTRL e SEL 24 HPD (Figura 4).

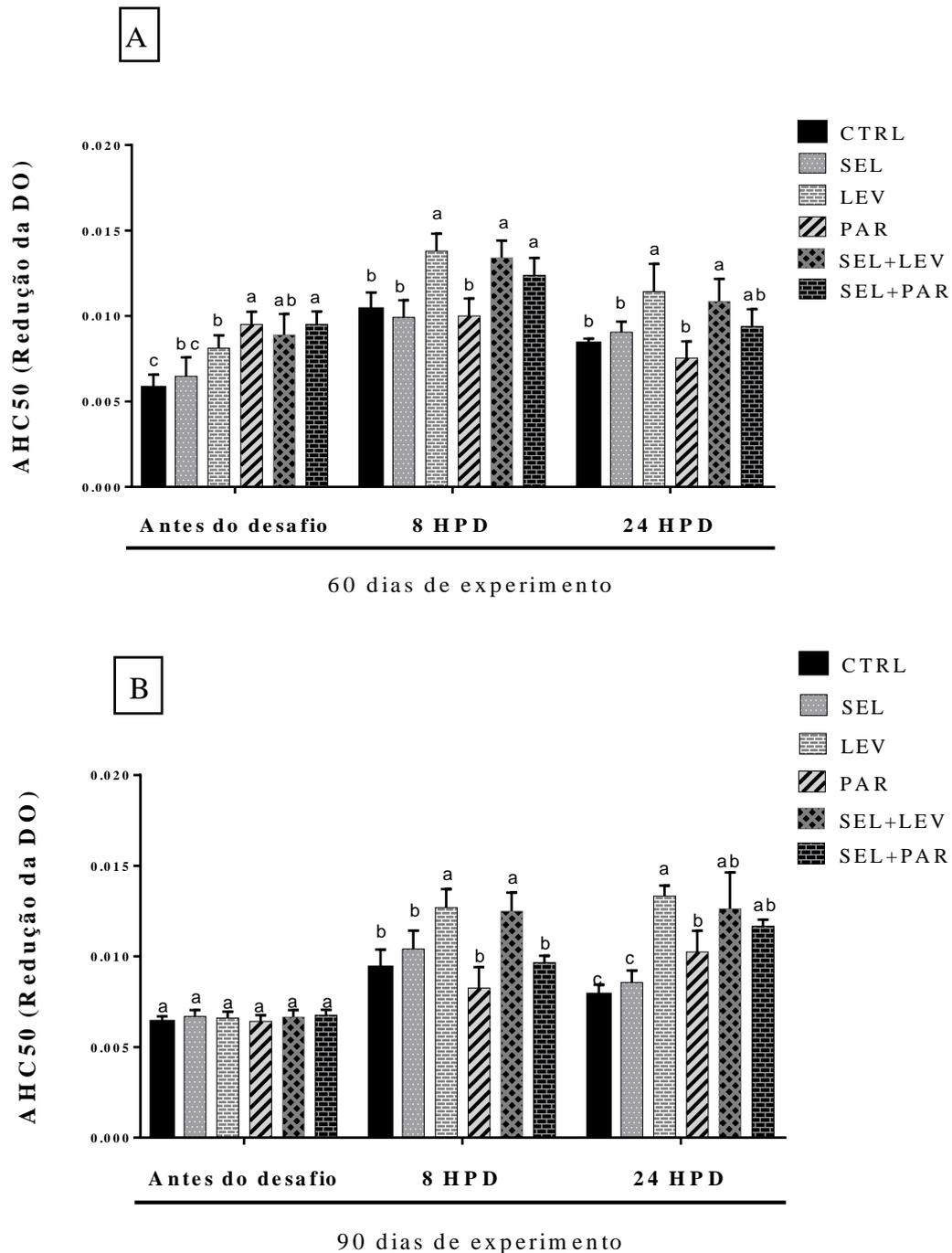
A concentração plasmática do cortisol no grupo PAR foi maior 8 HPD após 60 e 90 dias de alimentação. Os grupos SEL, LEV e SEL+LEV apresentaram concentração mais baixa que CTRL 8 HPD após 60 e 90 dias de fornecimento das dietas experimentais (Figura 5 A). Após 60 dias, a glicemia nos grupos SEL, LEV e SEL+LEV foi menor que no grupo CTRL ( $p < 0,05$ ). Após 90 dias, com 8HPD os grupos LEV, PAR, SEL+LEV e SEL+PAR apresentaram maior concentração de glicose que o grupo CTRL e SEL, que apresentaram valores semelhantes (Figura 5 B).



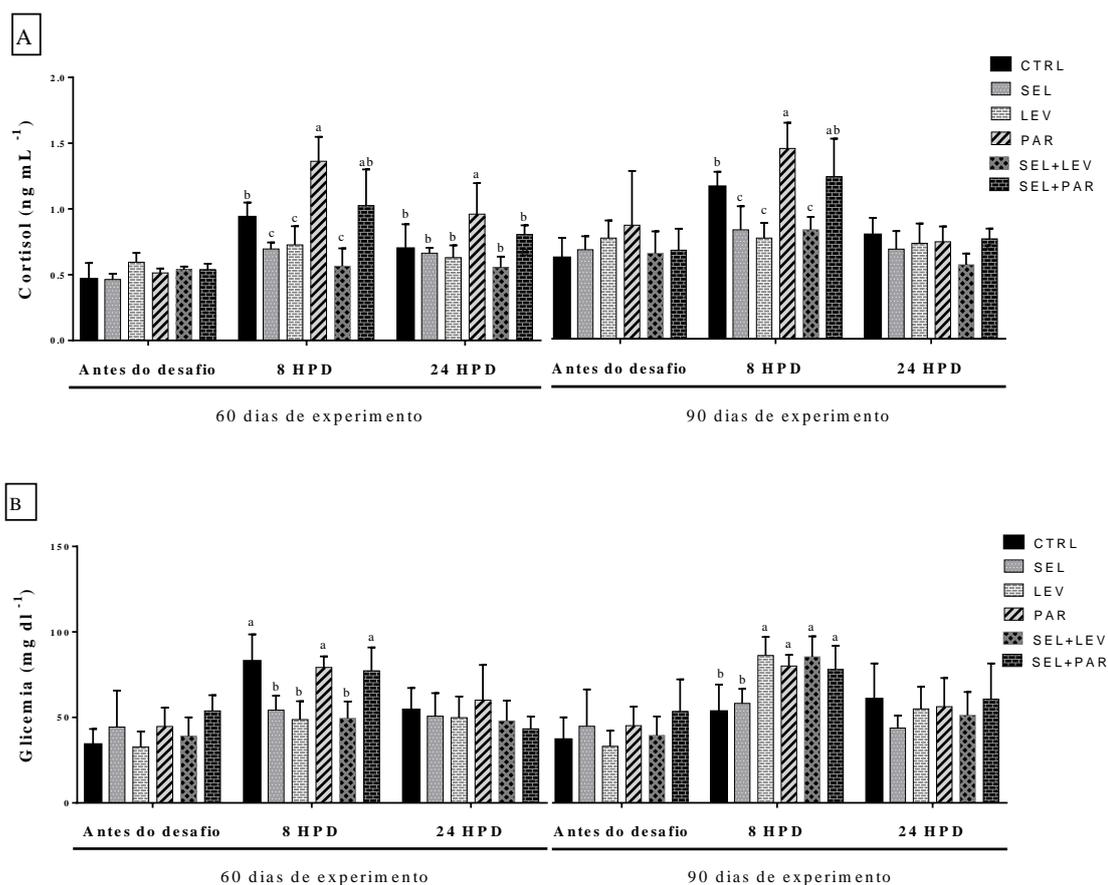
**Figura 2.** Atividade respiratória de leucócitos de tilápia-do-Nilo após 60 dias (A) e 90 dias (B) de alimentação com levedura selenizada (SEL), levedura (LEV), parede celular de levedura (PAR), selênio com levedura (SEL+LEV) e selênio com parede celular de levedura antes, após 8 e 24 horas do desafio com *A. hydrophila*. Letras distintas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo grupo de amostragens ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.** Atividade sérica de lisozima de tilápia-do-Nilo após 60 dias (A) e 90 dias (B) de alimentação com levedura selenizada (SEL), levedura (LEV), parede celular de levedura (PAR), selênio com levedura (SEL+LEV) e selênio com parede celular de levedura (SEL+PAR) antes, após 8 e 24 horas do desafio com *A. hydrophila*. Letras distintas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo grupo de amostragens ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Atividade hemolítica do sistema complemento (AHC50) de tilápia-do-Nilo após 60 dias (A) e 90 dias (B) de alimentação com levedura selenizada (SEL), levedura (LEV), parede celular de levedura (PAR), selênio com levedura (SEL+LEV) e selênio com parede celular de levedura (SEL+PAR), antes, após 8 e 24 horas do desafio com *A. hydrophila*. Letras distintas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo grupo de amostragens ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Concentração de Cortisol (A) e Glicose plasmática (B) de tilápia-do-Nilo alimentadas com dieta contendo levedura selenizada (SEL), levedura (LEV), parede celular de levedura (PAR), selênio com levedura (SEL+LEV) e selênio com parede celular de levedura (SEL+PAR) após 60 e 90 dias de alimentação com as dietas experimentais, antes, após 8 e 24 horas do desafio com *A. hydrophila*. Letras distintas indicam diferença entre os tratamentos em um mesmo grupo de amostragens ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

A eficácia da utilização da levedura *S. cerevisiae*, está intimamente relacionada aos fatores que influenciam sua colonização no intestino, como a concentração de microrganismos e o tempo de administração da dieta (Balcázar et al., 2008; Kesarcodi-Watson et al., 2008; Hai, 2015). A medida que a colonização se estabelece, há uma redução de patógenos ligados aos enterócitos através da produção de compostos antimicrobianos e competição por sítios de adesão e nutrientes (Wang, Li e Lin, 2008; Song et al., 2014; Akhter et al., 2015; Dawood e Koshio, 2016). A redução de patógenos no intestino promove um desbalanço na relação de multiplicação e apoptose celular com consequente crescimento dos vilos

e aumento da área de absorção de nutrientes, resultando no melhor aproveitamento dos alimentos consumidos e conseqüentemente, melhorando o desempenho produtivo (Kesarcodei-Watson et al., 2008; Dimitroglou et al., 2019). Por isto, neste experimento, o fornecimento de *S. cerevisiae* promoveu melhores respostas no desempenho produtivo das tilápias.

Além disso, o fornecimento de levedura viva juntamente com levedura selenizada proporcionou o melhor aproveitamento das dietas consumidas após 60 e 90 dias de experimento, resultando em melhor GP, CAA e TCE em relação aos demais tratamentos. O papel da levedura selenizada no crescimento dos animais pode ser atribuído à prevenção, redução e proteção dos peixes à presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) nocivas, reduzindo a apoptose celular e mantendo a atividade de substâncias facilmente oxidadas como carotenóides e vitamina A que podem aumentar a água e a proteína nas células (Sastre e Pallardó, 2000; Mansour et al., 2017). Isto justifica também o aumento da área de absorção de nutrientes no intestino promovido pelo uso de levedura selenizada e levedura.

Por outro lado, a utilização de parede celular de levedura demonstrou incrementar a resposta imunológica dos peixes e não o desempenho produtivo. Os principais componentes da parede celular de levedura são o  $\beta$ -glucano e o MOS, importantes polissacarídeos que estimulam a resposta imunológica em peixes (Klis et al., 2006; Minami, et al., 2011; Vallejos-Vidal et al., 2016). Embora o fornecimento isolado e concentrado destes compostos mostre importantes efeitos no desempenho produtivo de peixes (Ringø et al., 2010; Spring et al., 2015; Dawood et al., 2016; Carbone et al., 2016; Torrecillas et al., 2018), é possível que a quantidade fornecida não tenha sido suficiente para mostrar tal efeito. Por isto, neste experimento, o grupo PAR mostrou desempenho produtivo semelhante ao grupo controle. Embora na literatura seja relatado importantes efeitos da parede celular de levedura no crescimento de aves (Santin et al., 2001; Zhang et al., 2005), a resposta observada nas tilápias alimentadas com dieta suplementada com a parede celular de levedura pode ter ocorrido devido a um desbalanço na homeostase dos animais. Além disso, aparentemente a complexidade dos polissacarídeos constituintes da parede celular de levedura podem comprometer a

digestibilidade da fração proteica, prejudicando o desempenho produtivo dos animais (Murray e Marchant, 1986; Rumsey et al., 1990; Hisano et al., 2008; Calberg et al., 2015; Pongpet et al., 2016; Carlberg et al. 2018) justificando os resultados encontrados.

Os efeitos benéficos na modulação do sistema imunológico demonstrado pelas tilápias alimentadas com as dietas contendo *S. cerevisiae*, parede celular de levedura e levedura selenizada corroboram outros autores que os descreveram após desafio em peixes (Li e Gatlin, 2003; Wang et al., 2007; kücükbay et al., 2009;; Le e Fotedar, 2014; Huyben et al., 2017; Wang et al., 2019). Após 60 dias da alimentação com as dietas experimentais, os grupos PAR e SEL+PAR apresentaram maior atividade respiratória dos leucócitos em relação aos demais. Isto aconteceu porque nas células fagocíticas circulantes e teciduais, existem receptores específicos para os PAMP's presentes na parede celular de levedura que ao serem reconhecidos elevam sua capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio e secretam citocinas que mediam a formação e recrutamento de novas células brancas no sangue. Assim, a alta concentração de parede celular de levedura fornecida, promoveu o estímulo imunológico observado após 60 dias de alimentação. Por outro lado, as condições experimentais adotadas, assim como, os aspectos fisiológicos do intestino dos peixes podem não ter sido ideais para permitir a adesão e colonização da levedura fazendo com que seus efeitos na atividade respiratória de leucócitos só fossem observados 90 dias após a alimentação com a dieta.

O efeito da administração de selênio também só foi observado no *burst oxidativo* após 90 dias de fornecimento da dieta experimental nos grupos SEL e SEL+LEV. Takahashi et al., (2016) observaram efeito na atividade respiratória dos leucócitos com o uso de  $1,15\text{mg kg}^{-1}$  de levedura selenizada por 65 dias na dieta de *Piaractus mesopotamicus*. Assim, a ausência de efeito da levedura selenizada após 60 dias pode ter sido ocasionada pela baixa concentração de selênio utilizada. É provável que a suplementação dietética de selênio também promova o aumento do número de leucócitos circulantes na corrente sanguínea e consequente elevação do *burst oxidativo* após desafio bacteriano (Biller-Takahashi et al., 2015).

Uma vez que a lisozima é expressa, sintetizada e secretada por neutrófilos, monócitos e macrófagos (Abu-Elala et al., 2013), o aumento do número de células brancas também explica a elevação dos níveis séricos de lisozima encontrada nos grupos alimentados com selênio. Também já é conhecido que *S. cerevisiae* estimula a produção de lisozima em teleósteos (Abu-Elala et al., 2013). Entretanto, observamos neste experimento um efeito sinérgico do uso de Levedura/Levedura selenizada e parede celular de levedura/levedura selenizada na atividade da lisozima indicando uma importante ferramenta bactericida no combate à agentes infecciosos.

Após 60 dias de suplementação das dietas, os grupos SEL, LEV e SEL+LEV apresentaram redução nos níveis de cortisol e glicemia plasmática 8 HPD. Esta resposta é esperada na aquicultura e confirma os benefícios destes imunostimulantes frente aos efeitos deletérios do cortisol.

Após 90 dias de experimento, observamos a redução do cortisol com elevação da glicemia nos grupos LEV e SEL+LEV. Este efeito com o uso de levedura pode ser induzido pelo estímulo à glicólise e liberação do glicogênio no plasma como já foi sugerido por Abu-Elala et al., (2013). Com 90 dias de experimento, também observamos que o grupo LEV+SEL apresentou redução do cortisol 24 horas após o desafio, indicando que o uso de selênio pode manter o nível de cortisol baixo por mais tempo. A utilização de parede celular de levedura por 90 dias mostrou aumento na concentração de glicose e cortisol em relação ao grupo controle 08 HPD. Isto pode ter acontecido devido à demanda excessiva de energia na defesa metabólica devido ao estresse (Kumar et al., 2018). Observamos que a elevação do cortisol plasmático pode ter influenciado negativamente a AHC após 90 dias de alimentação nos grupos PAR e PAR+SEL. Já é conhecido que o hormônio cortisol modula a resposta imunológica e neste experimento, sugere-se que o fornecimento de parede celular de levedura por 90 dias tornou os animais mais susceptíveis ao estresse de manejo.

Como conclusão, este estudo forneceu boas evidências sobre a utilização de levedura selenizada, parede celular de levedura e levedura viva para a aquicultura. A utilização de levedura selenizada juntamente com levedura viva

apresenta melhor efeito no desempenho produtivo, resposta imunológica e estresse quando comparado ao uso dos aditivos isolados.

## 5. REFERÊNCIAS

Abreu, J. S.; Marzocchi-Machado, C.M.; Urbaczek, A.C.; Fonseca, L.M.; Urbinati, E.C. Leukocytes respiratory burst and lysozyme level in pacu (*Piaractus mesopotamicus Holmberg, 1887*). **Brazilian Journal of Biology**, v. 69, n. 4, p. 1133-1139, 2009.

Abu-Elala, N.; Marzouk, M.; Moustafa, M., Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v.1, n.1, p.21-29, 2013.

Akhter, N.; Wu, B.; Memon, A.M.; Mohsin, M., Probiotics and prebiotics associated with **Aquaculture: A review**, **Fish & Shellfish Immunology**, v.45, n. 2, p.733-741, 2015

Anderson, D. P.; Siwicki, A. K. Basic hematology and serology for fish health programs. In: SHARIFF, M.: ARTHUR, J.R.: SUBASINGHE, R.P. (Ed.) **Diseases in Asian Aquaculture II**. Manila: Fish Health Section, Asian Fisheries Society. Manila, Phillipines: Fish Health Section, Asian Fisheries Society, p. 185-202, 1995.

Bagni M.; Romano N.; Finoia, MG.; Abelli, L.; Scapigliati, G.; Tiscar, P.G., Short- and long-term effects of a dietary yeast beta-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 18, n. 4, p. 311-25, 2005.

Balcázar, J.L.; Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Cunningham, D.; Vendrell, D.; Múzquiz, J.L., The role of probiotics in **Aquaculture**. **Veterinary Microbiology**. v. 114, n. 3-4, p. 173-186, 2006.

Barman D.; Nen P.; Mandal S.C.; Kumar V., Immunostimulants for **Aquaculture Health Management. Journal of Marine Science: Research and Development.** v.134, n.3, 2013.

Biller-Takahashi, J.D.; Takahashi, L.S.; Mingatto, F.E.; Urbinati, E.C., The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu, *Piaractus mesopotamicus* **Fish & Shellfish Immunology.** v.47, p. 360-367, 2015.

Biller-Takahashi, J.D.; Takahashi, L.S.; Saita, M.V.; Gimbo, R.Y.; Urbinati, E.C. Leucocytes respiratory burst activity as indicator of innate immunity of pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Brazilian Journal of Biology,** v.73, n.2, p.425-429, 2013.

Boyd, C. E., **Water Quality in Ponds for Aquaculture.** Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University Press. 1990.

Carbone, D.; Faggio, C., Importance of prebiotics in **Aquaculture** as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. **Fish & Shellfish Immunology.** v. 54, p. 172-178, 2016.

Chiu, C-H.; Cheng, C-H.; Gua, W-R.; Guu, Y-K.; Cheng, W., Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. **Fish and Shellfish Immunology.** n. 29, p.1053–1059, 2010.

Dawood, M. A. O.; Koshio, S. Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp **Aquaculture: A review. Aquaculture,** v. 454, p. 243-251, 2016.

Deivasigamani B.; Subramanian, V., Applications of Immunostimulants in **Aquaculture: A Review. International Journal of Current Microbiology and Applied.** v.5, n.9, p.447-453, 2016.

Devi, P. A.; Padmavathy, P.; Aanand. S.; Aruljothi, K., Review on water quality parameters in freshwater cage fish culture. **International Journal of Applied Research.** v.3, n.5, p.114-120, 2017.

Dimitroglou, A; Merrifield, D.L.; Moate, R.; Davies, S.J.; Spring, P.; Sweetman, J., Dietary mannan oligosaccharide supplementation modulates intestinal microbial ecology and improves gut morphology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Journal of Animal Science**. v. 87, n. 10, p. 3226–3234, 2009.

Ellis, A.E., Lysozyme assays. In: Stolen J.S; Fletcher T.C.; Anderson D.P; Roberson B.S.; Muiswinkel W.B.; (Eds). **Techniques in Fish Immunology**. USA: SOS 413 publications, p. 101-103, 1990.

Furuya, W.M., Tabelas brasileiras para nutrição de Tilápias. 21 ed. Toledo: GFM, 2010.

Hai, N.V.; Research findings from the use of probiotics in tilapia **Aquaculture: A review**, **Fish & Shellfish Immunology**, v. 45, n.2, p. 592-597, 2015.

Hassan, M.S.; Soltan, M.A.; Ghonemy, M.M.R., Effect of synbiotics between *Bacillus licheniformis* and yeast extract on growth, hematological and biochemical indices of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Egyptian Journal of Aquatic Research**. n, 40, n. 2, p. 199-208, 2014.

He, S.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Shi, P.; Yao, B.; Ringø , E.; Yoon, I., Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. **Aquaculture** v. 294, n. 1-2, p. 99–107, 2009.

He, S.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Shi, P.; Yao, B.; Ringø , E.; Yoon, I., Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. **Aquaculture** v. 294, n. 1-2, p. 99–107, 2009.

Hisano, H.; Sampaio, F. G.; Barros, M. M.; Pezzato, L. E.; Composição nutricional e digestibilidade aparente da levedura íntegra, da levedura autolisada e

da parede celular pela Tilápia-do-Nilo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 1, p. 43-49, 2008.

Kesarcodi-Watson, A.; Kaspar, H.; Lategan, M.J.; Gibson, L.; Probiotics in **Aquaculture**: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. **Aquaculture**, v. 274, n.1, p. 1-14, 2008.

Klis, F. M.; Boorsma, A.; De Groot, P.W.J., Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v.23, n.3, p.185–202, 2006.

Kollár, R.; Reinhold, B.B.; Petráková, E.; Yeh, H.J.; Ashwell, G.; Drgonová, J.; Kapteyn, J.C.; Klis, F.M., Cabib. E.; Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->)3-glucan, and chitin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, n. 28, p. 17762-17775, 1997.

Kumar, N.; Krishnani, K.K.; Gupta, S.K.; Sharma, R4.; Baitha, R.; Singh, D.K.; Singh, N.P., Immuno-protective role of biologically synthesized dietary selenium nanoparticles against multiple stressors in *Pangasinodon hypophthalmus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v.78, p. 289-298, 2018.

Lin, Y.H., 2014; Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth, selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. **Aquaculture**. v. 430, p.114-119, 2014.

Lipke, P.N.; Ovalle, R., Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**. v. 180, n.15, p. 3735–3740, 1998.

Mansour A.T-E.; Goda, A.A.; Omar, E.A.; Khalil, H.S.; Estaban, M.A., Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 68, p. 516-524, 2017.

Meena D.K.; Das, P.; Kumar, S.; Mandal, S.C.; Prusty, A.K.; Singh, S.K.; Beta-glucan: An ideal immunostimulant in **Aquaculture** (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 39, n. 3, p, 431–57, 2013.

Minami, T.; Tanaka, T.; Takasaki, S.; Kawamura, K.; Hiratsuka, K., In vivo bioluminescence monitoring of defense gene expression in response to treatment with yeast cell wall extract. **Plant Biotechnology**. v. 28, n. 5, p.481-484, 2011.

NRC (National Research Council), **Nutrient requirements of fish**. National Academy Press, Washington DC, USA. 124p, 1993.

Pinpimai, k.; Rodkhum, C.; Chansue, N Katagiri , T.; Maita, M.; Pirarat, N, The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in Veterinary Science**. v. 102, p.103–111, 2015.

Ringø, E.; Olsen, R.E.; Gifstad, T. Ø.; Dalmo, R.A.; Amlund, H.; Hemre, G.-I.; Bakke, A., Prebiotics in **Aquaculture: a review**. **Aquaculture Nutrition**. v. 6, n. 2, p. 117-136, 2010.

Ringø, E.; Rolf, R.E.; Vecino, J.L.G.; Wadsworth, S.; Song, S.K., Use of immunostimulants and nucleotides in **Aquaculture: a review**. **Journal of Marine Science: Research & Development**.v.2, n.1, p.1000104, 2012.

Santin, E.; Maiorka, A.; Macari, M.; Grecco, M.; Sanchez, J.C.; Okada, T.M.; Myasaka, A.M., Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **The Journal of Applied Poultry Research**. v.10, n.3, p. 366-244, 2001.

Sastre, J.; Pallardó, F.V.; García de la Asunción, J.; Viña, J., Mitochondria, oxidative stress and aging, **Free Radical Research**. v. 32, n.3, p.189-198, 2000.

Soares, M.P.; Oliveira, F.C.; Cardoso, I.L.; Urbinati, E.C.; Meldau, C.C.; Hisano, H., Glucan-MOS® improved growth and innate immunity in pacu stressed and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 73, p. 133-140, 2018.

Song, S.K.; Beck, B.R.; Kim, D.; Jungjoon, J.P.; Kim, Kim, H.D.; Ringø, E., Prebiotics as immunostimulants in **Aquaculture: A review**. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 40, n.1, p.40-48, 2014.

Spring, P.; Wenk, C.; Connolly, A.; Kiers, A., A review of 733 published trials on Bio-Mos®, a mannan oligosaccharide, and Actigen®, a second generation mannose rich fraction, on farm and companion animals. **Journal of Applied Animal Nutrition**. v. 3, n.8, 2015.

Tafalla, C.; Bøgdal, J.; Dalmo, R.A., Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 35, n. 6, p. 1740-1750, 2013.

Takahashi, L.S.; Biller-Takahashi, J.D.; Mansano, C.F.M.; Urbinati, E.C.; Gimbo, R.Y.; Saita, M.V., Long-term organic selenium supplementation overcomes the trade-off between immune and antioxidant systems in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Fish & Shellfish Immunology**. v.60, p. 311-317, 2016.

Torrecillas, S.; Ribero-Ramírez, F.; Izquierdo, M.S.; Caballero, M.J.; Makol, A.; Soares-Bregua, P.; Fernandez-Montero, A.; Rottlant, J.; Montero, D., Feeding European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles with a functional synbiotic additive (mannan oligosaccharides and *Pediococcus acidilactici*): Na effective tool to reduce low fishmeal and fish oil gut health effects? **Fish & Shellfish Immunology**. v. 81, p. 10-20, 2018.

Vallejos-Vidal, E.; Reyes-López, F.; Teles, M.; MacKenzie, S., **The response of fish to immunostimulant diets**. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 56, p. 34-69, 2016.

Vetvicka, V.; Vannucci, L.; Sima, P., The Effects of  $\beta$ -Glucan on Fish Immunity. **North American Journal of Medical Science**. v. 5, n.10, p. 580-588, 2013.

Wang, Y.B.; Li, J-R.; Lin, J., Probiotics in **Aquaculture**: Challenges and outlook, **Aquaculture**. v. 281, n.1-4, p. 1-4, 2008.

Whittington, R.; Lim, C.; Klesius, P.H., Effect of dietary  $\beta$ -glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**. v. 248, n. 1-4, p. 217-225, 2005.

Zanuzzo, F.S.; Sabioni, R.E.; Montoya, L.N.F.; Favero, G.; Urbinati, E.C., Aloe vera enhances the innate immune response of pacu (*Piaractus*

*mesopotamicus*) after transport stress and combined heat killed *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 65, p. 198-205, 2017.

Zanuzzo, F.S.; Urbinati, E.C.; Rise, M.L.; Hall, J.R.; Nash, G.W.; Gamperl, A.K., *Aeromonas salmonicida* induced immune gene expression in *Aloe vera* fed steelhead trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **Aquaculture**. v. 435, p.1-9, 2015.

Zhang A.W.; Lee, B.D.; Lee, S.K.; Lee, K.W.; Na, G.H., Song, K.B.; Lee, C.H., Effects of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Cell Components on Growth, Performance, Meat Quality, and Ileal Mucosa. **Development of Broiler Chicks Poultry Science**. v. 84, n. 7, p 1015–1021, 2005.

Rezaei A. V.; Ahmadifard, N.; Tukmechi, A.; Agh, N.; Improvement of reproductive indices, lysozyme activity, and disease resistance in live-bearing ornamental fish, *Poecilia latipinna* using *Artemia* supplementation with treated yeast cell, *Saccharomyces cerevisiae*. **Aquaculture Research**. v.50, p.72–79. 2019.