



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

VITÓRIA DAITX DE OLIVEIRA

Níveis de suplementação do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo: efeito na estrutura do epitélio intestinal e junção oclusiva

Florianópolis

2021

Vitória Daitx de Oliveira

Níveis de suplementação do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nilo: efeito na estrutura do epitélio intestinal e junção oclusiva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Aquicultura

Orientador: Dra. Débora Machado Fracalossi
Coorientador: Dra. Bruna Mattioni

Florianópolis

2021

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

Daitx de Oliveira, Vitória

Níveis de suplementação do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo: efeito na estrutura do epitélio intestinal e junção oclusiva / Vitória

Daitx de Oliveira ; orientadora, Débora Machado Fracalossi, coorientadora, Bruna Mattioni, 2021.

p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Integridade intestinal. 3. Microvilosidades. 4. Morfologia intestinal. 5. Oreochromis niloticus. I. Machado Fracalossi, Débora . II. Mattioni, Bruna . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. IV. Título.

Vitória Daitx de Oliveira

Níveis de suplementação do aditivo alimentar VILIGEN™ em dietas para juvenis de tilápia-do-nylo: efeito na estrutura do epitélio intestinal e junção oclusiva

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Bruno Corrêa da Silva
Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina

Prof. Robson Andrade Rodrigues, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Aquicultura.

Coordenação do Programa de Pós-graduação em Aquicultura

Profª. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por te me guiado e acompanhado ao longo da realização do mestrado.

À minha família, meus pais e irmãos, por todo o apoio, suporte e incentivo durante essa jornada e ao longo da vida.

À minha orientadora, Dr.^a Débora Machado Fracalossi, pela confiança em me aceitar como sua orientada e membro da equipe Laboratório de Nutrição de Espécies Aquícolas (LABNUTRI/UFSC), por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, além de todo o suporte durante o mestrado.

À minha coorientadora, Dr.^a Bruna Mattioni, pelas primeiras orientações e suporte metodológico durante a realização dessa pesquisa.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Bruno Corrêa da Silva e Prof., Dr. Robson Andrade Rodrigues, pela disponibilidade de participar da avaliação desse trabalho e por suas valiosas contribuições à esta dissertação.

À toda a equipe do LABNUTRI/UFSC, que foram fundamentais para a realização deste trabalho, contribuindo das mais diversas maneiras para a sua conclusão.

Aos meus queridos amigos e companheiros de equipe, Jhonis Ernzen Pessini e Douglas Ismael Cadorin, não somente por todo suporte técnico durante essa jornada, mas principalmente pela amizade construída ao longo desses anos.

Aos técnicos do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) pelos ensinamentos e apoio na realização das análises de microscopia eletrônica.

Ao Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI/UFSC) pela disponibilidade de utilizar as suas dependências e materiais para a realização das análises de quantificação das proteínas das junções oclusivas. Em especial, ao técnico Jacó Joaquim Matos, pelos ensinamentos, auxílio e persistência no enfrentamento do desafio analítico proposto nesta pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Aquicultura (PPGAQI-UFSC) pelos ensinamentos ao longo do curso. Ao Secretário do PPGAQI, Carlito Klunk, por seu profissionalismo e competência.

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

E, por fim, agradeço ao meu namorado João Vicente por todo o amor, paciência e colaboração dedicados a mim e as minhas escolhas e, principalmente, por sempre me incentivar e acreditar na minha capacidade de alcançar meus sonhos.

RESUMO

Aditivos alimentares são empregados na nutrição animal e desencadeiam múltiplas respostas benéficas ao organismo dos peixes. O VILIGEN™ (Alltech®, EUA) é um aditivo alimentar que contém butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco desenvolvido com o propósito de promover a saúde intestinal em animais de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação dietética deste aditivo 1) na morfologia e integridade intestinal, 2) na barreira intestinal, por meio da quantificação da proteína claudina-2; em juvenis de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*). O ensaio de dose-resposta durou 60 dias, onde 840 peixes (peso médio inicial de 1,98 g) foram distribuídos em 30 unidades experimentais (200 L), pertencente a um sistema de recirculação com temperatura controlada em 28 °C. Os animais foram alimentados com dietas contendo níveis crescentes de inclusão de VILIGEN™ (0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg⁻¹), testados em seis repetições. Para analisar as alterações morfológicas ou na estrutura da barreira física intestinal, a porção medial do intestino dos peixes foi analisada com auxílio da microscopia eletrônica de transmissão e de varredura. Além disso, quantificou-se a proteína da junção oclusiva claudina-2 através da técnica de *western blot*. Os dados de morfologia intestinal e da proteína claudina-2 foram submetidos à análise de regressão polinomial para determinação do melhor nível de inclusão de VILIGEN™ nas dietas, a um nível de significância de 5%. Nas eletromicrografias detectou-se diferença significativa na altura das microvilosidades, as quais apresentaram uma resposta quadrática ao aumento dos níveis dietéticos de VILIGEN™. A maior altura das microvilosidades e melhor desenvolvimento das pregas intestinais foi com a inclusão de 2,50 g kg⁻¹ e 2,40 g kg⁻¹ do aditivo na dieta, respectivamente. A integridade macroestrutural foi notavelmente diferente entre os peixes alimentados com dietas contendo diferentes doses do aditivo. O intestino das tilápias suplementadas com 2,40 g kg⁻¹ apresentaram a melhor integridade do tecido intestinal, com menor fusão das pregas intestinais, sem a presença de deformidades e lesões, indicando que essa dose preveniu ou reparou possíveis danos intestinais. Já os peixes que não receberam suplementação e os que receberam a maior suplementação (4,80 g kg⁻¹) apresentaram maior deformidade e fusões das pregas, respectivamente. A quantificação da proteína da junção claudina-2 não foi significativamente afetada pela suplementação. Por fim, conclui-se que a suplementação dietética do aditivo VILIGEN™ a 2,50 g kg⁻¹ na dieta melhora a morfologia intestinal e a integridade do epitélio do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo, sem alterar a barreira física intestinal.

Palavras-chave: Aquicultura. Integridade intestinal. Microvilosidades. Morfologia intestinal. *Oreochromis niloticus*.

ABSTRACT

Feed additives are used in animal nutrition and trigger multiple beneficial responses to fish organisms. VILIGEN™ (Alltech®, USA), a feed additive designed to promote intestinal health includes sodium butyrate, hydrolyzed yeast, and zinc proteinate. This study aimed to evaluate the effect of dietary supplementation of this additive on 1) intestinal morphology and integrity, 2) intestinal barrier by quantifying the claudin-2 protein in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). The dose-response trial lasted 60 days, where 840 fish (1.98 g) were randomly distributed into 30 experimental units (200 L), connected to a water recirculation system with controlled temperature (average 28 °C). The fish were fed experimental diets with increasing levels of VILIGEN™ (0.00, 0.60, 1.20, 2.40, and 4.80 g kg⁻¹) with six replicates per dietary treatment. To analyze changes in the morphology or structure of the intestinal physical barrier, the medial portion of the gut was analyzed by transmission and scanning electron microscopy. In addition, the claudin-2 tight junction protein was quantified using the western blot technique. Gut morphology and claudin-2 protein data were submitted to polynomial regression analysis to determine the best inclusion level of VILIGEN™ in the diets, at a 5% significance level. Electron micrographs enabled us to register a significant difference in the height of the microvilli that showed a quadratic response to the increasing dietary levels of VILIGEN™. The highest height of microvilli and the best development of gut folds was registered at 2.50 g kg⁻¹ and 2.40 g kg⁻¹ inclusion levels, respectively. The macrostructural integrity was notably different among fish fed diets containing different doses of the additive. The intestines of tilapia supplemented with 2.40 g kg⁻¹ showed the best integrity of intestinal tissue, presenting less fusion of the gut folds, without deformities or lesions, indicating that that dose prevented or repaired possible intestinal damage. Fish fed diet devoid of supplementation and those fed the highest supplementation level (4.80 g kg⁻¹) had the highest fold deformity and fold fusions, respectively. The amount of the claudin-2 junction protein was not affected by the different levels of supplementation. Our findings show that the dietary supplementation of VILIGEN™ at 2.50 g kg⁻¹ improves the gut morphology and the integrity of the intestinal epithelium of juvenile Nile tilapia, without altering the intestinal physical barrier.

Keywords: Aquaculture. Intestinal integrity. Microvilli. Intestinal morphology. *Oreochromis niloticus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crescimento mundial da Aquicultura em comparação com as demais cadeias de produção animal, entre 2018 e 2028.	13
Figura 2. Componentes extrínsecos, intrínsecos e imunológicos da barreira intestinal. CC: célula caliciforme; MC: muco; MV: microvilosidade; GALT: tecido linfóide associado ao intestino (barreira imunológica).	18
Figura 3. Estrutura dos complexos juncionais das células.	19
Figura 4. Estrutura molecular das junções oclusivas mostrando a interação entre as proteínas membranares, placa citosólica e proteínas do citoesqueleto. JAM: moléculas de adesão juncional; Ocludina; ZO: <i>zonula occludens</i>	22
Figura 5. Estrutura molecular das junções oclusivas das células do intestino medial de tilápiado-nilo.	22
Figura 6. Estrutura molecular das proteínas da família claudina. AE: alça extracelular; C: terminal-C; CC: cauda citoplasmática; DT: domínio transmembranar; N: terminal-N.	24
Figura 7. Diferentes mecanismos de ação dos ácidos orgânicos.	29
Figura 8. Estrutura molecular do butirato de sódio.	30
Figura 9. Estrutura molecular da β G de levedura.	38
Figura 10. Estrutura molecular do MOS de levedura.	40
Figura 11. Eletromicrografia de varredura do epitélio intestinal medial de juvenis de tilápiado-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN TM por 60 dias. L: Lúmen, S: serosa, P: prega intestinal, ML: músculo longitudinal.	56
Figura 12. Altura das microvilosidades do intestino medial de juvenis de tilápiado-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN TM por 60 dias (n=6). A linha tracejada representa o valor estimado pela equação polinomial.	57
Figura 13. Eletromicrografia de transmissão do epitélio intestinal medial de juvenis de tilápiado-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN TM por 60 dias. A) Não suplementado, B) Suplementação de 0,60 g kg ⁻¹ , C) Suplementação de 1,20 g kg ⁻¹ , D) Suplementação de 2,40 g kg ⁻¹ , E) Suplementação de 4,80 g kg ⁻¹ . L: Lúmen, MV: microvilosidades, JO: junção oclusiva, JA: junção aderente, D: desmossomo, CJ: complexo juncional.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Categorias dos aditivos alimentares utilizados na nutrição animal.	26
Tabela 2. Efeitos da utilização do butirato de sódio em diferentes espécies de peixes.....	32
Tabela 3. Efeitos da suplementação dietética de levedura hidrolisada em diferentes espécies de peixes.	43
Tabela 4. Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.	50
Tabela 5. Morfometria das microvilosidades do intestino medial em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias (n = 6). Valores médios de seis repetições.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β G	β -glucanas
CAT	Catalase
CoA	Coenzima A
CR3	Receptor do sistema complemento 3
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina
IGF-1	Fator I do crescimento dependente de insulina
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GH	Hormônio do crescimento
GHR-1	Hormônio liberador de hormônio do crescimento 1
GPx	Glutathione peroxidase
GUK	guanilato quinase
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
JAMs	Moléculas de adesão juncional
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
MBL	Lectina de ligação à manose
MDA	Malondialdeído
MOS	Mananoligossacarídeos
MAGUK	Guanilato quinase associada à membrana
MyoD	Proteína 1 de determinação de mioblastos
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutase
SR	Receptores sequestradores
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptores <i>toll-like</i>

TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
Zn Zinco
ZOs *Zonula occludens*
ZO-1 *Zonula occluden 1*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	PANORAMA DA ATIVIDADE AQUÍCOLA.....	13
1.2	Tilápia-do-nilo	14
1.3	NUTRIÇÃO E SAÚDE INTESTINAL em PEIXES	15
1.3.1	Estrutura e função da barreira intestinal.....	17
1.3.2	Junções oclusivas	21
1.4	ADITIVOS ALIMENTARES NA NUTRIÇÃO DE PEIXES.....	25
1.4.1	Ácidos orgânicos	27
1.4.1.1	<i>Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos</i>	27
1.4.2	Ácido butírico e butirato de sódio.....	29
1.4.3	Levedura.....	33
1.4.3.1	<i>Nucleotídeos</i>	35
1.4.3.2	<i>Parede celular</i>	37
1.4.3.2.1	β -glucanas	37
1.4.3.2.2	Mananoligossacarídeos - MOS.....	39
1.4.3.3	<i>Levedura hidrolisada.....</i>	42
1.4.4	Zinco	44
1.5	OBJETIVOS	46
1.5.1	Objetivos Geral.....	46
1.5.2	Objetivos Específicos	46
2	ARTIGO CIENTÍFICO	47
2.1	INTRODUÇÃO.....	48
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.2.1	Dietas experimentais.....	50
2.2.2	Peixes e condições experimentais	51
2.2.3	Coletas de amostras	52
2.2.4	Análises de microscopia eletrônica.....	52
2.2.4.1	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	52
2.2.4.2	<i>Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	53
2.2.5	Análise de <i>Western blotting</i>	54
2.2.6	Análises estatísticas.....	55
2.3	RESULTADOS	55

2.3.1	Morfologia e integridade da mucosa intestinal.....	55
2.3.2	Proteína da junção oclusiva claudina 2	58
2.4	DISCUSSÃO	59
2.5	CONCLUSÃO	65
2.6	REFERÊNCIAS	65
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL.....	74

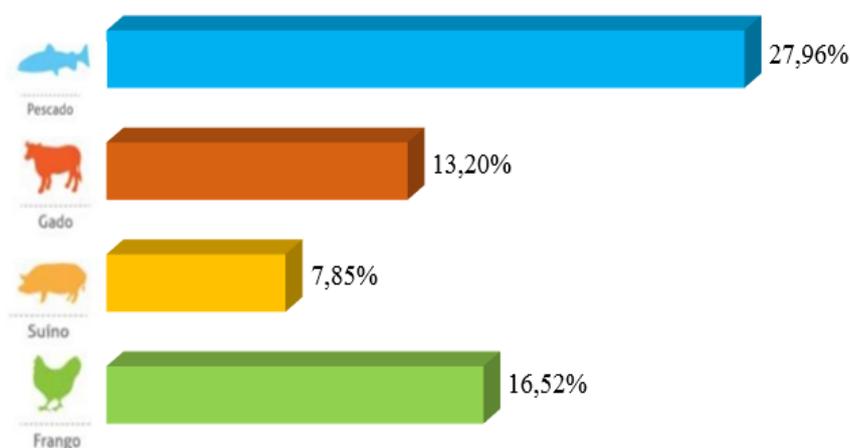
1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 PANORAMA DA ATIVIDADE AQUÍCOLA

A aquicultura vem se destacando como atividade sustentável e competitiva na produção de alimentos de excelente qualidade e alto valor biológico em todo o mundo (OECD/FAO, 2019). Essa competitividade só foi possível devido aos avanços tecnológicos, que incluem novas técnicas de criação, com custos mais acessíveis de produção e ganhos significativos na produtividade (SIQUEIRA, 2018).

Globalmente, a produção de organismos aquáticos alcançou 178,5 milhões de toneladas em 2018, apresentando um aumento de 3,4% em comparação ao ano anterior. A aquicultura contribuiu com 82,1 milhões de toneladas de peixes, sendo responsável por fornecer 52% do pescado utilizado para o consumo humano no ano de 2018 (FAO, 2020). Nos últimos anos, o crescimento na produção de pescados está impulsionado exclusivamente pela expansão da produção aquícola, pois a pesca tem se mantido estável nas últimas décadas (SILVA, 2014). A aquicultura deverá aumentar seu aporte produtivo para em média 102,2 milhões de toneladas em 2028, resultando em um aumento de 28% (OECD/FAO, 2019). Já outras atividades responsáveis por fornecerem também proteína animal à população, como avicultura, pecuária e suinocultura apresentarão crescimentos inferiores quando comparado ao da aquicultura (Figura 1).

Figura 1. Crescimento mundial da Aquicultura em comparação com as demais cadeias de produção animal, entre 2018 e 2028.



Fonte: OECD-FAO, 2019.

Mundialmente, 89% da produção de organismos aquáticos é destinada ao consumo humano, e essa parcela deverá continuar crescendo até 2028 (OECD/FAO, 2019). A produção mundial aquícola é liderada pela China, contribuindo com uma quantidade superior à de todos os outros países combinados (FAO, 2018). Já a América Latina e o Caribe contribuem com apenas 3,4% da produção; no entanto, há a previsão de crescimento de 12% na próxima década. Paraguai, Chile e Brasil serão responsáveis por esse crescimento, com um aumento de 30%, 21% e 17%, respectivamente, na sua produção, conforme estimativa da OECD/FAO (2019).

O Brasil é o 13º maior produtor mundial em aquicultura (FAO, 2019), foram 802 mil toneladas de peixes em 2020, um crescimento de 5,93% em relação ao ano anterior (PEIXE BR, 2021). No país, a produção aquícola é liderada pela criação da espécie exótica tilápia-do-nylo (60%) (*Oreochromis niloticus*), seguida pela criação de espécies nativas (33%), onde se destaca o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (PEIXE BR, 2021).

1.2 TILÁPIA-DO-NILO

Tilápias são peixes de água doce nativos do continente Africano, pertencentes à família dos ciclídeos. Sua introdução ocorreu em diversos países tropicais, subtropicais e até de clima temperado (PILLAY, 1990). Entre todas as espécies pertencentes a esse grupo, a tilápia-do-nylo, originária da bacia do rio Nilo no Leste da África, é a mais importante na atividade aquícola. Entre anos 2000 e 2017 a sua criação representou 70 a 80% da produção total de tilápias, ocupando o terceiro lugar na produção mundial de peixes, em 2017 (FAO, 2019).

Introduzida no Brasil na década de 1970, importada da Costa do Marfim, com a finalidade de povoar reservatórios públicos localizados na região nordeste (ZANIBONI FILHO, 2004), atualmente representa 60% de toda produção aquícola brasileira, estando presente em todas as regiões do país (PEIXE BR, 2021). O Brasil ocupa o quarto lugar na produção mundial de tilápia, atrás somente da China, Indonésia e Egito (FAO, 2018), com uma produção de 486 mil toneladas. Os estados com maior produção da espécie são Paraná (34,1%), São Paulo (14,5%) e Minas Gerais (8,6%). No estado de Santa Catarina, a produção de tilápia-do-nylo representa cerca de 77% da produção total da piscicultura, totalizando 40 mil toneladas em 2020 (PEIXE BR, 2021).

Caracterizada como uma espécie de origem tropical, com faixa de temperatura ideal de criação entre 26 a 30 °C, sendo a letalidade atingida tanto em temperaturas de 6 a 10 °C (ABD EL-NABY et al., 2019) como em temperaturas superiores a 42 °C (FAO, 2005). Tolerância baixas concentrações de oxigênio dissolvido e a faixa ideal de pH é entre 7 e 8 (ZANIBONI

FILHO, 2004). A tilápia-do-nilo possui hábito alimentar onívoro, destacando a ingestão de invertebrados aquáticos, organismos bentônicos, larvas de peixes e detritos (EL-SAYED, 2020). A linhagem de tilápia mais criada no Brasil é a GIFT (*Genetic Improved Farmed Tilapia*), obtida do melhoramento genético desenvolvido nas Filipinas (BENTSEN et al., 1998) e introduzida no país no ano de 2005 (BARROSO et al., 2018).

A tilápia-do-nilo possui diversas características que justificam sua destacada produção, dentre estas: alta taxa de crescimento, tolerância a variações ambientais, boa aceitação de ração, resistência a enfermidades e ao estresse ambiental (EL-SAYED, 2020), fácil reprodução e larvicultura (HE et al., 2013). Além disso, possui carne branca, com baixo teor de gordura ($0,9 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$) e de calorias ($117 \text{ kcal } 100 \text{ g}^{-1}$), moderado rendimento de filé (35 a 40%), sem a presença de espinhos intramusculares e boa aceitação no mercado (AYROZA, 2009).

1.3 NUTRIÇÃO E SAÚDE INTESTINAL EM PEIXES

Atualmente, é amplamente reconhecido na aquicultura que o adequado desenvolvimento dos animais está diretamente relacionado a uma abordagem apropriada da nutrição (KIRON, 2012). Os nutrientes e ingredientes utilizados nas dietas não possuem somente o objetivo de suprir às exigências nutricionais e proporcionar o crescimento, mas também de dar suporte aos processos metabólicos, respostas imunológicas a estressores fisiológicos, patogênicos e ambientais e, principalmente, melhorar a saúde intestinal dos peixes (AKTER et al., 2016; LALL; TIBBETTS, 2009).

Uma série de mecanismos fisiológicos complexos e dinâmicos ocorrem no trato digestório (CELI et al., 2017). Além das funções de digestão e absorção dos nutrientes, o intestino é responsável por fornecer uma barreira física semipermeável entre o lúmen intestinal e o meio intracelular (ALASSANE-KPEMBI; OSWALD, 2015). Esta barreira permite a passagem dos nutrientes necessários, água e eletrólitos do lúmen para a circulação sanguínea, evitando a entrada de antígenos alimentares, patógenos, toxinas e fatores pró-inflamatórios que podem prejudicar o animal (ASSIMAKOPOULOS et al., 2018). Além disso, é responsável por regular a homeostase fisiológica para suportar estressores infecciosos e não infecciosos (KOGUT; ARSENAULT, 2016), hospedando uma grande população de microrganismos e células imunológicas (JHA et al., 2019).

Alterações na permeabilidade intestinal dão origem a uma patologia conhecida como "intestino permeável", relacionada a retardos no desenvolvimento, perda de peso e até a morte

dos animais (STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017). Portanto, o desempenho animal, a eficiência alimentar e sua saúde geral dependem intensamente da saúde intestinal (JHA et al., 2019). Embora a saúde intestinal seja objeto recente de grande interesse em estudos com animais de produção, além de ser uma ferramenta importante para avaliação das intervenções na nutrição animal (CELI et al., 2017), sua definição científica ainda não está bem clara (KOGUT; ARSENAULT, 2016).

Diante disso, recentemente Celi et al. (2017) propuseram uma definição para o termo saúde intestinal: “estado estacionário em que o microbioma e o trato intestinal estão em equilíbrio simbiótico, onde o bem-estar e o desempenho do animal não são limitados pela disfunção intestinal”. De acordo com Conway (1994), os três principais componentes da saúde intestinal são: dieta, estrutura e função da mucosa intestinal e microbiota normal e equilibrada. Estes componentes, quando combinados com adequada digestão e absorção dos nutrientes, além do eficaz funcionamento do sistema imunológico, são capazes de manter a homeostase e a funcionalidade do intestino, o que, por sua vez, melhora o desempenho, saúde e o bem-estar dos animais (CELI et al., 2017).

A composição das dietas em termos de nutrientes, ingredientes e aditivos alimentares, pode modular o desenvolvimento e a funcionalidade do trato intestinal, incluindo o sistema imunológico, principalmente o tecido linfoide associado ao intestino (do inglês *gut-associated lymphoid tissue*, GALT) e a microbiota nele presente (CONWAY, 1994). Deste modo, a capacidade de cada componente nutricional de promover a saúde deve ser levada em consideração durante a formulação de rações (KIRON, 2012). As características essenciais das dietas para beneficiar a saúde intestinal são: ausência de fatores antinutricionais, capacidade tampão e fornecimento de compostos benéficos (DE LANGE et al., 2010).

A dieta pode modificar a riqueza e a biodiversidade da microbiota (HUTTENHOWER et al., 2012), assim como o metabolismo desses microrganismos, modulando a produção de peptídeos antimicrobianos que podem interferir no crescimento e adesão de patógenos no intestino (CELI et al., 2017). A dieta pode atuar também no sistema imunológico dos peixes, por meio da ativação das células do GALT, produção de citocinas intestinais e na migração de células imunes do sangue, durante situações de desafio e enfermidades (CELI et al., 2017).

Além da escolha das matérias-primas apropriadas para atender às exigências nutricionais dos peixes, o processo correto de formulação e fabricação irá garantir rações com propriedades químicas e físicas apropriadas para promover a saúde dos peixes (KIRON, 2012). Desequilíbrios na composição dos ingredientes, formulação ou na higienização, podem prejudicar o desenvolvimento e a saúde dos animais (KIRON, 2012). As deficiências

nutricionais podem influenciar na integridade dos tecidos epiteliais, reduzindo a produção de muco e alterando a composição dos fluidos corporais e, conseqüentemente, predispondo o peixe a infecções (LALL; TIBBETTS, 2009). Do mesmo modo, a presença de antinutrientes, como alguns tipos de fibra alimentar, fitato, inibidores de protease, saponinas, taninos e algumas micotoxinas, também podem comprometer a integridade do intestino (CELI et al., 2017).

Além desses fatores, a proibição do uso de antibióticos como promotores de crescimento na União Europeia, em 2006, seguida de outras partes do mundo (ONRUST et al., 2015) deu origem a uma crescente busca por novas estratégias sanitárias ambientalmente viáveis. Diante desse cenário internacional e nacional, pesquisas atuais estão focadas em alternativas aos antibióticos para a produção sustentável (SEAL et al., 2013). O desenvolvimento de ingredientes e terapias alternativas que otimizem a saúde intestinal de maneira eficaz e continuem proporcionando o melhor crescimento, saúde intestinal e diminuição da susceptibilidade a patógenos são exemplos de alternativas aos antibióticos e de grande interesse atual para a indústria de rações (CELI et al., 2017). Portanto, muitos aditivos alimentares, desencadeadores de diferentes respostas, além daquelas promovidas pelo seu valor nutricional, estão sendo desenvolvidos e utilizados para influenciar especificamente a saúde intestinal (GOOSSENS, 2015). Essas substâncias que promovem a saúde e integridade intestinal englobam principalmente a classe dos ácidos orgânicos, aminoácidos, leveduras e subprodutos, minerais, além de alguns probióticos e prebióticos (GOOSSENS, 2015).

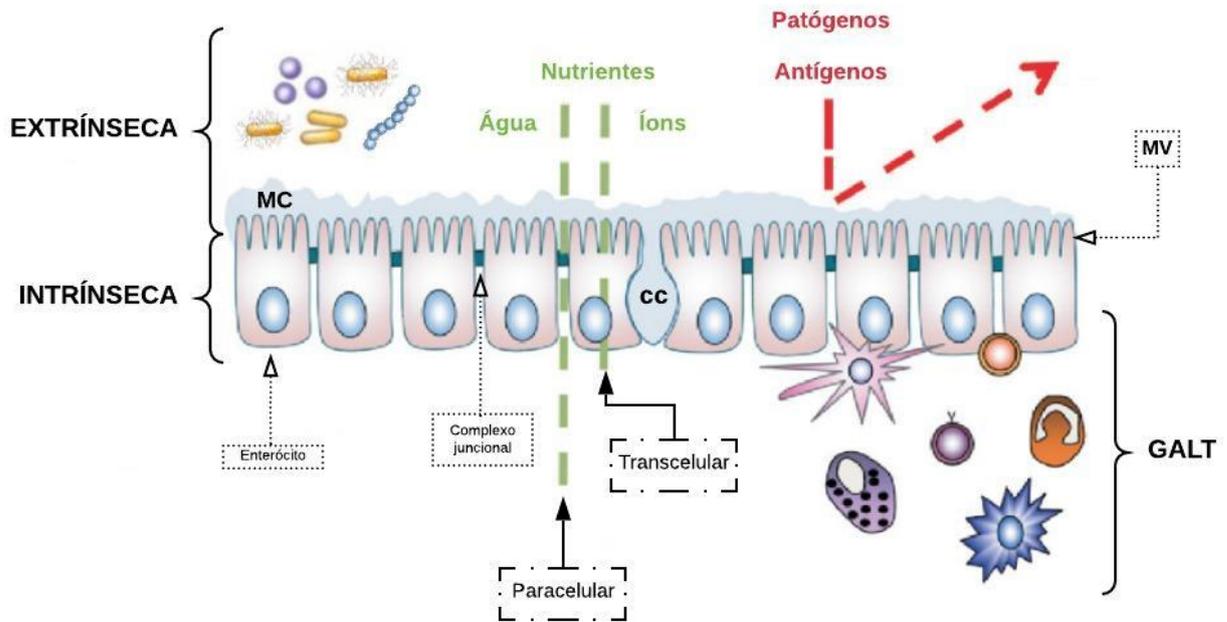
1.3.1 Estrutura e função da barreira intestinal

Nos teleósteos, a pele, as brânquias e o intestino, apesar das diferenças estruturais e funcionais, são as principais superfícies de contato e barreiras contra o meio externo (GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013). A importância dessas barreiras nos animais aquáticos é maior quando comparada aos terrestres, já que eles interagem continuamente com o meio onde vivem (ROMBOUT; YANG; KIRON, 2014).

O intestino dos peixes é um órgão multifuncional, onde a mucosa intestinal está constantemente exposta a uma variedade de nutrientes, antígenos e patógenos (WITTIG; ZEITZ, 2003). O intestino atua como uma barreira física e semipermeável, e a sua eficiência depende da relação entre a produção de muco, integridade epitelial (FAURE et al., 2006) e sistema imunológico, os quais, associados a uma microbiota equilibrada entre microrganismos comensais, temporários e patogênicos, contribuem para a fortificação desta barreira (WILLING; VAN KESSEL, 2010). A barreira intestinal é formada por três porções: extrínseca,

intrínseca e imunológica (Figura 6) (JUTFELT, 2011), cada qual com uma função específica e ao mesmo tempo integrada.

Figura 2. Componentes extrínsecos, intrínsecos e imunológicos da barreira intestinal. CC: célula caliciforme; MC: muco; MV: microvilosidade; GALT: tecido linfoide associado ao intestino (barreira imunológica).



Fonte: adaptado de Sundh e Sundell (2015).

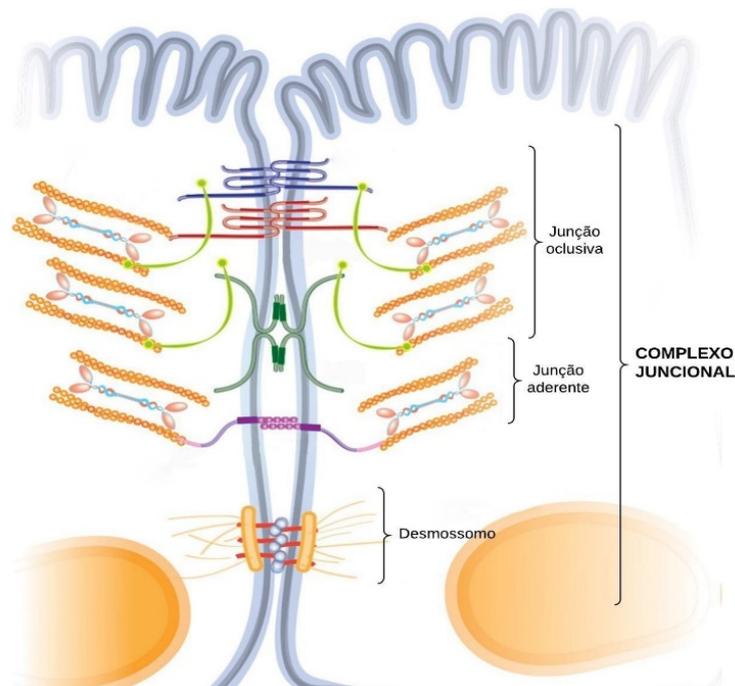
A barreira extrínseca consiste em uma camada de muco (Figura 4), o qual é secretado pelas células caliciformes (SCHROERS et al., 2009). É composto principalmente pelas mucinas, que são glicoproteínas de alto peso molecular (CELI et al., 2017), importantes para imprimir viscosidade ao muco e permitir o aprisionamento de patógenos (JOHANSSON; HANSSON, 2016). Entretanto, o muco é enriquecido com uma infinidade de fatores imunológicos humorais, como peptídeos antimicrobianos, lisozimas, lectinas, imunoglobulinas e citocinas (SALINAS; MAGADÁN, 2017).

Os microrganismos patogênicos presentes no intestino podem ficar retidos nessa camada de muco e, conseqüentemente, serem eliminados com o bolo fecal por meio dos movimentos peristálticos (CELI et al., 2019). Desta forma, é minimizada a translocação microbiana e de antígenos para o meio intracelular estéril e a conseqüente ativação imunológica excessiva (KOGUT; ARSENAULT, 2016). A camada de muco também protege as microvilosidades dos enterócitos das enzimas digestivas e do atrito físico com as moléculas e patógenos, preservando a integridade do epitélio (FARHADI et al., 2003).

Associada à camada de muco, a microbiota intestinal comensal (Figura 6), além de auxiliar na digestão e absorção dos nutrientes, exerce outras funções, tais como: 1) atua como agente trófico da mucosa, 2) compete com os patógenos por nutrientes, 3) produz peptídeos antimicrobianos, 4) contribui para o funcionamento correto do sistema imune, prevenindo a resposta imunológica excessiva (SEKIROV et al., 2010) e 5) melhora o funcionamento da barreira intestinal como um todo (MASLOWSKI; MACKAY, 2011; SEAL et al., 2013). Portanto, a composição e diversidade da microbiota, bem como os metabólitos produzidos pelas bactérias, são cruciais para a saúde intestinal (ONRUST et al., 2015).

Já a barreira intrínseca corresponde ao epitélio de revestimento do intestino (Figura 4), composto por uma camada de células colunares absorptivas, denominadas enterócitos, conectados entre si pelos complexos juncionais (Figura 6) (JUTFELT, 2006). Os complexos são formados pelas junções oclusivas (localizadas na parte apical das células), seguidas pelas junções aderentes e pelos desmossomos (Figura 7) (CELI et al., 2019), que mantêm o epitélio unido, regulando o fluxo de pequenas moléculas (NIKLISSON, 2013), evitando a entrada de substâncias nocivas (ANDRADE et al., 2015). As junções aderentes e os desmossomos são responsáveis por manter a estrutura e o contato célula-célula, já as junções oclusivas têm a função de selar o espaço intercelular e controlar a permeabilidade paracelular (SUNDELL; SUNDELL, 2015).

Figura 3. Estrutura dos complexos juncionais das células.



Fonte: Adaptado de Stewart (2017).

A absorção intestinal é realizada e controlada de duas formas: 1) transporte transcelular, através dos enterócitos, via transportadores dependentes de energia e canais e 2) transporte paracelular (Figura 6) (SUNDH; SUNDELL, 2015; TURNER, 2009). A passagem pela via paracelular é regulada pelas junções oclusivas, que consistem em numerosas proteínas localizadas na região latero-apical das membranas dos enterócitos (ANDRADE et al., 2015), sendo as principais estruturas responsáveis pela permeabilidade epitelial (ROBINSON et al., 2015).

Associado aos enterócitos, na sua superfície apical, existe uma densa matriz de microvilosidades (Figura 6), que aumentam a produção de enzimas digestivas e a área de absorção dos nutrientes (JUTFELT, 2006). No entanto, a maior densidade dessas estruturas pode reduzir a exposição das junções intercelulares, principalmente das oclusivas, fornecendo uma barreira intestinal mais eficaz contra patógenos (STANDEN et al., 2015). Por fim, há uma barreira imunológica, localizada abaixo do epitélio, que é conhecida como GALT (Figura 6) (CELI et al., 2017). Esta barreira é composta por uma variedade de células e moléculas imunes (LAZADO; CAIPANG, 2014), capazes de responder a substâncias e microrganismos patogênicos (GOMEZ; SUNYER; SALINAS, 2013), mas de tolerar imunologicamente as bactérias comensais (SCALDAFERRI et al., 2012). O sistema imunológico possui dois principais ramos, o inato e o adaptativo, que envolvem múltiplos componentes humorais e celulares, incluindo lisozimas, imunoglobulinas, moléculas do sistema complemento, citocinas, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos (POHLENZ; GATLIN, 2014). Os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos, juntamente com as células epiteliais e as caliciformes, produzem e regulam as respostas imunológicas intestinais (PARRA; REYES-LOPEZ; TORT, 2015). A barreira GALT deve ser capaz de responder de forma rápida e potente a qualquer ruptura na barreira epitelial ou desafio patogênico, ativando a resposta inata e posteriormente a adaptativa (MOESER; POHL; RAJPUT, 2017).

A integridade da barreira intestinal pode ser afetada por muitos fatores, como por exemplo 1) pela ingestão de micotoxinas (STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017), 2) por alterações na composição do muco (BISCHOFF et al., 2014) e 3) pela presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas. Todos estes fatores são capazes de desintegrar as junções intercelulares (O'HARA; BURET, 2008) e promover a apoptose das células epiteliais (RODRIGUES et al., 2016), além de ativar o sistema imunológico inato, gerando uma cascata de sinalização intracelular, liberando principalmente citocinas pró-inflamatórias, identificadas como moléculas potenciais para promover o rompimento das junções oclusivas (TURNER, 2009). Todos os fatores supracitados resultam no aumento da permeabilidade e/ou

ruptura da barreira intestinal, acarretando maior translocação tanto do conteúdo luminal, como de microrganismos nocivos para a lâmina própria e, posteriormente, atenuando a inflamação intestinal (CLAYBURGH; SHEN; TURNER, 2004).

A interrupção da homeostase e o estabelecimento de uma resposta inflamatória é um processo metabólico dispendioso ao animal (POHLENZ; GATLIN, 2014), resultando em mudanças metabólicas, onde os principais nutrientes são redirecionados para amparar o sistema imunológico (JOHNSON, 2012). Por isso, interações equilibradas e dinâmicas entre os componentes da barreira intestinal são essenciais para a manutenção da homeostase do trato intestinal (KIM; HO, 2010).

1.3.2 Junções oclusivas

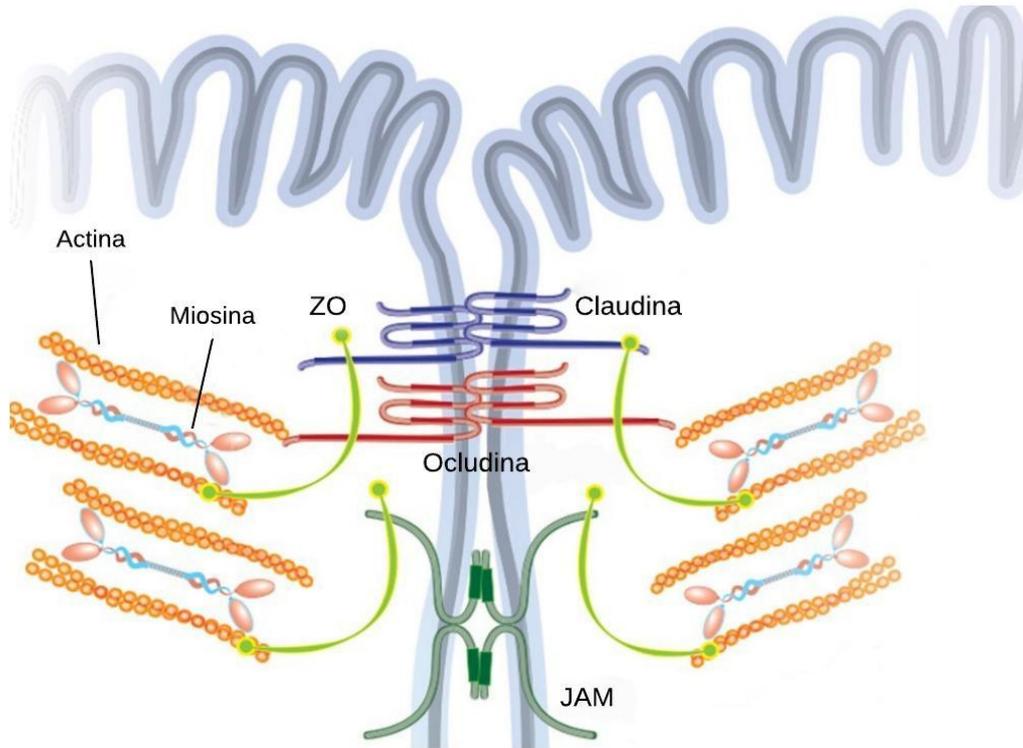
As junções oclusivas são estruturas complexas e dinâmicas, formadas por multiproteínas juncionais capazes de cruzar lateralmente a bicamada lipídica e ligar as células adjacentes (RODRIGUES et al., 2016). Existe mais de 40 tipos de proteínas responsáveis pela formação das junções oclusivas nos epitélios, endotélios e células mielinizadas (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003).

As junções oclusivas formam dois tipos de barreira: 1) a paracelular, responsável pela formação de uma barreira seletiva semipermeável de moléculas através do tecido e 2) a intramembranar, atuando como uma "cerca" que restringe a troca de componentes entre o domínio apical e basolateral da membrana (ZIHNI et al., 2016). A via paracelular apresenta menor eficiência de absorção se comparada à transcelular, porém, o aumento da permeabilidade por essa via é vital para aumentar a absorção de alguns nutrientes de difícil absorção e de uma gama de drogas terapêuticas (KOSIŃSKA; ANDLAUER, 2013). Já no tráfego de vesículas (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006), a via paracelular é crucial nas vias de sinalização que regulam a permeabilidade intestinal, proliferação e diferenciação celular (MATTER; BALDA, 2003).

A nível molecular, as junções oclusivas consistem principalmente em proteínas transmembranares adesivas, chamadas claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional (JAMs) (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006), unidas a proteínas citoplasmáticas de ligação à actina, denominadas *zonula occludens* (ZOs) (Figura 8) (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; WELLS et al., 2017). Analisando esta estrutura no intestino medial da tilápia-do-nilo, por meio da microscopia eletrônica de transmissão, a junção oclusiva é uma região discreta de aposição

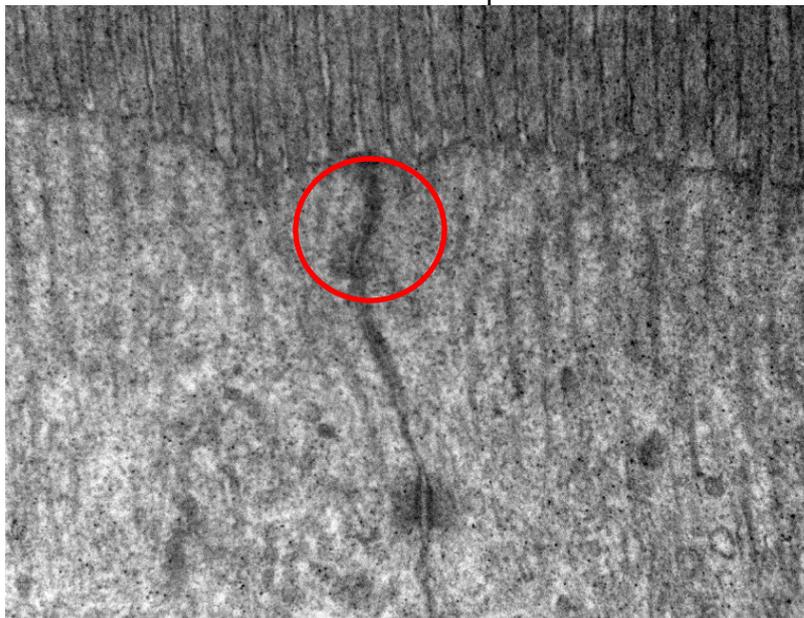
das membranas entre células epiteliais adjacentes, localizada na porção mais próxima ao lúmen (Figura 9) (CLAYBURGH; SHEN; TURNER, 2004).

Figura 4. Estrutura molecular das junções oclusivas mostrando a interação entre as proteínas membranares, placa citosólica e proteínas do citoesqueleto. JAM: moléculas de adesão juncional; Ocludina; ZOs: *zonula occludens*.



Fonte: Adaptado de Stewart (2017).

Figura 5. Estrutura molecular das junções oclusivas das células do intestino medial de tilápias-do-nilo.



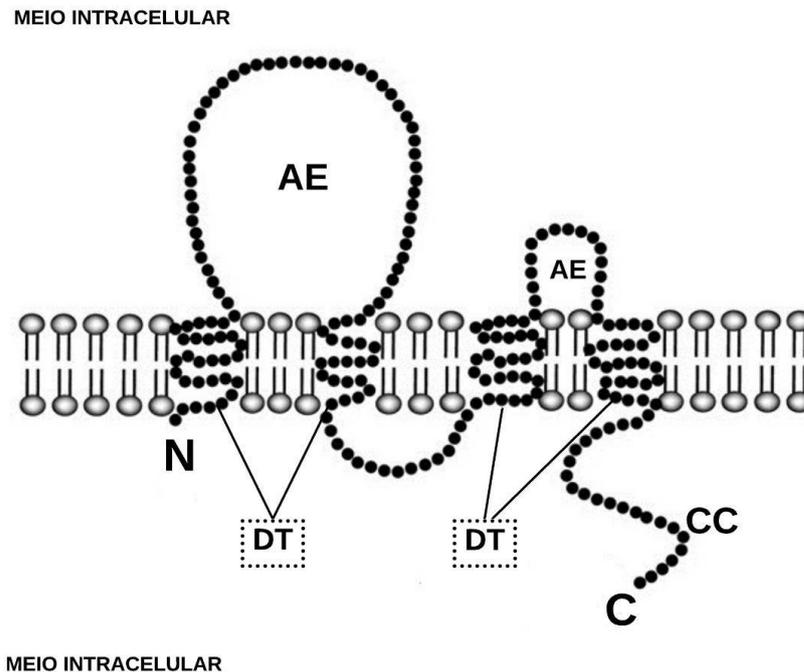
Fonte: arquivo pessoal.

As ocludinas são fosfoproteínas de membrana, com peso molecular entre 62-82 kDa (SAKAKIBARA et al., 1997). Possuem quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares, duas caudas citoplasmáticas, uma com C-terminal longo e a outra com N-terminal curto, além de um domínio PDZ (KOSÍŇSKA; ANDLAUER, 2013), importante para manter a estabilidade e a função de barreira (CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017). JAMs são proteínas transmembranares glicosiladas que pertencem à superfamília das imunoglobulinas (Ig). Possui um domínio transmembranar, duas alças extracelulares semelhantes à Ig, uma cauda extracelular com N-terminal e uma cauda citoplasmática C-terminal com um domínio PDZ (KOSÍŇSKA; ANDLAUER, 2013). As JAMs são expressas por diversos tipos de células, incluindo epiteliais, endoteliais e imunológicas (WILLIAMS et al., 1999). As ZOs são membros da família das proteínas guanilato quinase, associadas à membrana (MAGUK) (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003). Essa classe é formada por três proteínas: ZO-1, ZO-2 e ZO-3, compostas por três domínios PDZ, um SH₃ e um semelhante à guanilato quinase (GUK), além de uma região de ligação complexo actina-miosina (KOSÍŇSKA; ANDLAUER, 2013). Essas proteínas interagem entre si e ancoram proteínas de membrana como claudinas, ocludinas e JAMs ao citoesqueleto de actina, presente no citoplasma (GONZÁLEZ-MARISCAL et al., 2003).

As claudinas constituem uma família de mais de 20 proteínas integrais de membrana, com peso molecular variando entre 18-27 kDa (CHIBA et al., 2008). São as proteínas mais essenciais das junções oclusivas, pois sem elas nenhuma barreira paracelular é formada (TSUKITA; TANAKA; TAMURA, 2019). Constituem a maior parte da arquitetura da junção oclusiva e geralmente são consideradas responsáveis pela regulação da permeabilidade do epitélio de vertebrados (GÜNZEL; FROMM, 2012). A expressão das claudinas é bastante variável entre as células e tecidos (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006), sendo que essa variabilidade está relacionada a diferentes resistências elétricas transepiteliais (TER) e seletividades iônicas encontradas (TSUKITA; FURUSE, 2002). Possuem quatro domínios transmembranares, duas alças extracelulares, uma cauda citoplasmática com um terminal-C e um domínio PDZ (Figura 10) (KOSÍŇSKA; ANDLAUER, 2013). As alças são importantes nas interações homofílicas (ligação de um receptor molecular à uma molécula idêntica) e/ou heterofílicas (ligação de moléculas de adesão em uma célula com uma molécula de adesão não idêntica na célula adjacente), bem como na formação dos canais (KOSÍŇSKA; ANDLAUER, 2013). A cauda citoplasmática está envolvida na ancoragem da claudina ao citoesqueleto, por meio de interações do seu domínio PDZ com os domínios presentes nas proteínas citoplasmáticas (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006). Essas estruturas executam funções

diferentes, que podem ser separadas em dois grupos: as formadoras de barreira (claudina-1,-3, -4, -5, -8, -9, -11 e -14) e as responsáveis pela formação dos poros ou canais (claudina-2, -7, -12 e -15) (SUZUKI, 2013). Todas as claudinas formadoras de canais exibem pelo menos um tipo de seletividade, seja para cátions (claudina -2, -10 e -15), ânions (claudina-10 e -17) ou água (claudina-2) (KRUG; SCHULZKE; FROMM, 2014).

Figura 6. Estrutura molecular das proteínas da família claudina.
 AE: alça extracelular; C: terminal-C; CC: cauda citoplasmática;
 DT: domínio transmembranar; N: terminal-N.



Fonte: Adaptado de Schneeberger (2004).

Mudanças nas concentrações da claudina podem afetar de diferentes formas a integridade da barreira intestinal (FINDLEY; KOVAL, 2009). Por exemplo, a regulação negativa da claudina-5 e claudina-8 pode reduzir a função de barreira (ZEISSIG et al., 2007). Em contraponto, a claudina 2, necessária à formação de canais de absorção de Na^+ , K^+ e água (KRUG; SCHULZKE; FROMM, 2014), quando desregulada, promove inflamação (GÜNZEL; YU, 2013).

A claudina-2 é uma proteína de membrana integral de 25 kDa, predominantemente expressa em epitélios com vazamento (LUETTIG et al., 2015). Recentemente, foi evidenciado que a sua presença no intestino é primordial para a homeostase da absorção de solutos e nutrientes (RODRIGUES et al., 2016). Em geral, o mecanismo de absorção de alguns nutrientes depende do gradiente eletroquímico de Na^+ , que normalmente é muito maior no

lúmen intestinal do que dentro das células (WADA et al., 2013). A permeabilidade de Na^+ pelas claudinas, permite que esse cátion acesse o lúmen, mantendo os níveis adequados de Na^+ luminal, dando suporte assim à absorção dos nutrientes Na^+ -dependente, como glicose, aminoácidos, lipídios e micronutrientes (WADA et al., 2013). Entretanto, a sua expressão pode ser alterada em diferentes condições fisiológicas e patológicas, como em doenças infecciosas e inflamação (GÜNZEL; FROMM, 2012). Nas doenças inflamatórias intestinais, o aumento na expressão da claudina 2 está associado com a diminuição e/ou redistribuição das proteínas de barreira; essa alteração, associada à apoptose epitelial leva à disfunção da barreira, aumento da permeabilidade de íons e água, resultando em diarreia, vazamento do epitélio e má absorção de nutrientes (LUETTIG et al., 2015). De acordo com Powell (1981), a claudina 2 foi identificada desbalanceada em peixes que apresentavam inflamação.

A permeabilidade das junções oclusivas em geral pode ser afetada por diversos estímulos, tais como: 1) depleção de energia, que regula negativamente as junções oclusivas, 2) mudança no nível de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), reduzindo a permeabilidade paracelular, 3) liberação de algumas citocinas, 4) estresse oxidativo (KOSIŃSKA; ANDLAUER, 2013), 5) radicais livres, 6) peptídeos dietéticos e 7) microrganismos patogênicos (LERNER; MATTHIAS, 2015). Dada a complexidade da estrutura e a importante função das proteínas das junções oclusivas, quando estas são alteradas, o estado fisiológico das células epiteliais e/ou endoteliais também são dramaticamente alterados (LERNER; MATTHIAS, 2015).

1.4 ADITIVOS ALIMENTARES NA NUTRIÇÃO DE PEIXES

O crescimento do setor aquícola tem intensificado cada vez mais os sistemas de criação, fazendo com que os peixes sejam expostos continuamente a agentes estressores. O aprimoramento da nutrição animal, visando propiciar não só o crescimento, mas uma melhora na saúde intestinal e no sistema imunológico, essenciais na prevenção da ocorrência de enfermidades (KIRON, 2012). Isto é particularmente importante na aquicultura, onde o tratamento de enfermidades é dificultado grandemente pelo meio aquático.

A Instrução Normativa nº 44 de 15 de dezembro de 2015, que regulamenta o uso de aditivos destinados à alimentação animal, define-os como:

Substância, microrganismo ou produto formulado, adicionado intencionalmente aos produtos, que não é utilizada normalmente como ingrediente, tenha ou não valor nutritivo e que melhore as características dos produtos destinados à alimentação animal ou dos produtos animais, melhore o desempenho dos animais sadios e atenda às necessidades nutricionais (BRASIL, 2015).

Segundo as diretrizes do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), para a autorização e registro de aditivos alimentares na nutrição animal é necessário 1) emprego de tecnologia adequada na fabricação, 2) inclusão na dieta em quantidades necessárias à obtenção do efeito desejado (respeitando a concentração máxima) e 3) imprimir influência positiva nas características do produto destinado à alimentação, produtividade dos animais ou dos produtos de origem animal. Os aditivos utilizados na nutrição animal podem ser classificados de acordo com suas funções e propriedades, sendo incluídos em uma ou mais categorias (Tabela 1).

Tabela 1. Categorias dos aditivos alimentares utilizados na nutrição animal.

Categoria	Definição	Exemplos
Tecnológicos	Adicionada ao produto com fins tecnológicos	Adsorvente, aglomerante, antioxidante, conservante, emulsificante, estabilizante, espessantes, gelificantes, entre outros
Sensoriais	Substância utilizada para melhorar ou modificar as propriedades organolépticas ou as características visuais	Corante e pigmentantes, aromatizante e palatilizante
Nutricionais	Utilizada para manter ou melhorar as propriedades nutricionais	Vitaminas, provitaminas, oligoelementos ou compostos de oligoelementos, aminoácidos, seus sais e análogos, ureia e seus derivados
Zootécnicos	Substância utilizada para influir positivamente na melhoria do desempenho dos animais	Ácidos orgânicos ou inorgânicos, probióticos, prebióticos e simbióticos

Fonte: MAPA, 2004.

A categoria de aditivos zootécnicos pode ainda ser dividida em três grupos funcionais (MAPA, 2015):

- 1) Digestivo: substância que facilita a digestão dos alimentos, atuando sobre determinadas matérias primas destinadas à fabricação de produtos para a alimentação animal;
- 2) Equilibrador da microbiota: microrganismos que formam colônias ou outras substâncias definidas quimicamente que têm um efeito positivo sobre a microbiota do trato digestório;
- 3) Melhorador de desempenho: substâncias definidas quimicamente que melhoram os parâmetros de produtividade, excluindo-se os antimicrobianos.

Neste estudo foi testado o aditivo zootécnico VILIGENT™ (Alltech®, EUA) que atua como melhorador de desempenho e equilibrador da microbiota intestinal. Este é composto principalmente por 1) um ácido orgânico, o butirato de sódio; 2) levedura hidrolisada desidratada, que é rica em polissacarídeos e nucleotídeos e 3) um mineral quelado, o proteinato

de zinco, desenvolvido com o propósito de melhorar saúde, integridade intestinal e sistema imunológico e, conseqüentemente, o desempenho dos animais.

1.4.1 Ácidos orgânicos

Os acidificantes são substâncias compostas por ácidos orgânicos e inorgânicos, os quais são utilizados (individualmente ou na forma de “*blends*”) como antimicrobianos na indústria de ração animal (DEFOIRDT et al., 2009). Os ácidos orgânicos são substâncias que contém uma ou mais carboxilas em sua molécula, gerando compostos derivados dos ácidos carboxílicos, como aminoácidos, ácidos graxos, coenzimas e outros metabólitos intermediários (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). São encontrados como 1) constituintes naturais dos alimentos de origem vegetal e animal, oriundos da fermentação natural de microrganismos, degradação/oxidação de ácidos graxos de cadeia longa ou 2) compostos sintetizados quimicamente (NG; KOH, 2017). Já os ácidos inorgânicos são de origem mineral e se dividem em hidrácidos (formados pelo hidrogênio e um ametal) e oxiácidos (união do hidrogênio, ametal e oxigênio). Entre os acidificantes, os ácidos orgânicos são os mais utilizados comercialmente, devido ao menor potencial de corrosão e toxicidade, quando comparados aos ácidos inorgânicos (HERMES, 2011).

Na nutrição animal, normalmente são utilizados os ácidos orgânicos fracos de cadeia curta, os quais estão associados à atividade antimicrobiana, como alternativa ao uso dos antibióticos como promotores de crescimento (BEDFORD; GONG, 2018). Estes ácidos orgânicos possuem de um a sete átomos de carbono na molécula e produzem menor quantidade de prótons ao se dissociarem (BRAZ, 2007).

Os ácidos orgânicos, além de serem encontrados na forma livre, apresentam-se também na forma de sais de cálcio, potássio e sódio. Esses sais geralmente são inodoros, propiciando melhor palatabilidade quando adicionados à dieta, são pouco voláteis e apresentam-se na forma sólida, facilitando o manejo na fabricação da ração (GUILLOTEAU et al., 2010).

1.4.1.1 Mecanismo de ação dos ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos possuem diversos modos de ação, atuando na conservação das rações, redução das bactérias patogênicas, digestibilidade de nutrientes, fornecimento de energia e melhoria na morfologia intestinal (Figura 3), os quais, conseqüentemente, aumentam

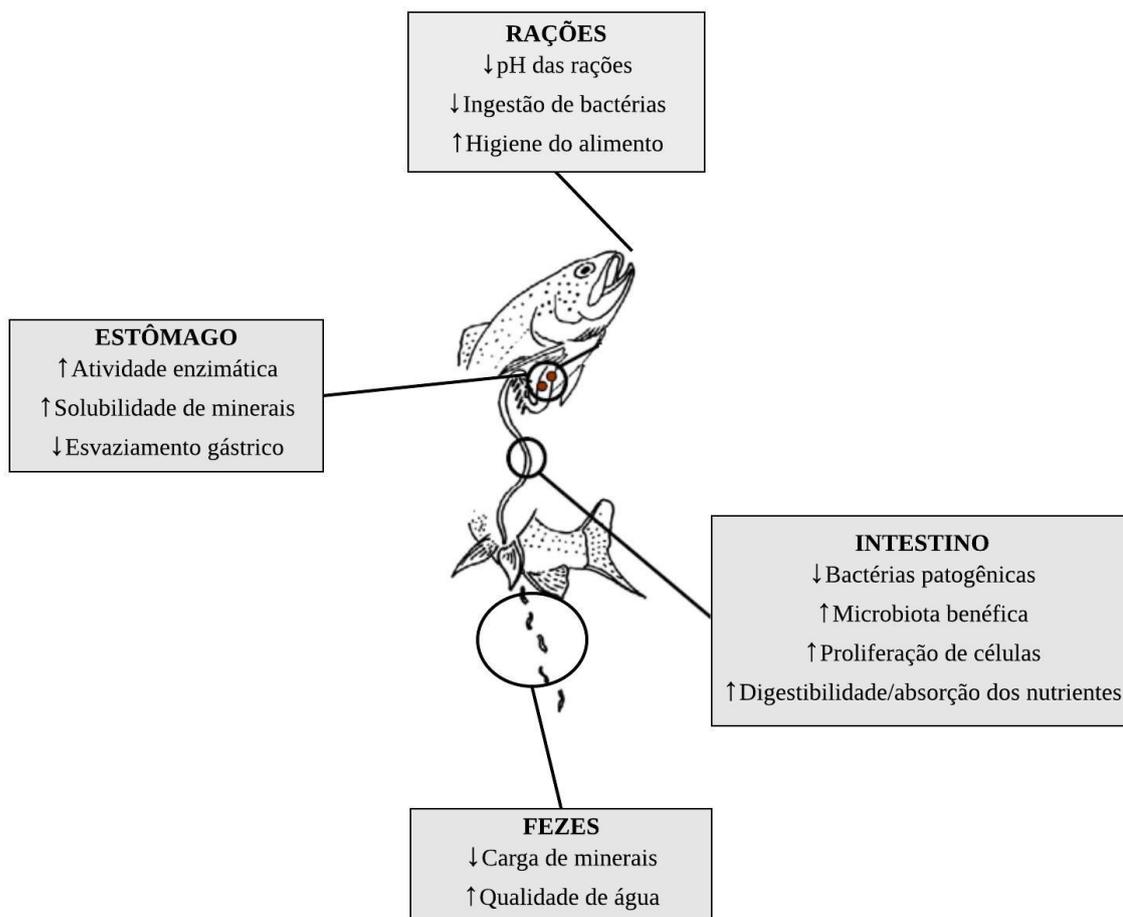
o desempenho produtivo dos animais (BRAZ, 2007; FRANCO, 2009; RAFACZ-LIVINGSTON et al., 2005).

O uso dos ácidos orgânicos, aliado às secreções ácidas estomacais, proporciona a acidificação do conteúdo gástrico, resultando na ativação do pepsinogênio (forma inativa da pepsina) em pepsina, com conseqüente aumento da atividade proteolítica, melhorando a digestibilidade proteica (BURNELL; CROMWELL; STAHLY, 1988). Além disso, produtos finais da digestão com baixo pH estimulam a secreção de bicarbonato e de enzimas pancreáticas ao chegarem no intestino, exercendo um papel importante na regulação do esvaziamento gástrico (CUNNINGHAM, 1992) e na absorção dos nutrientes (BRAZ, 2007). Os ácidos orgânicos atuam também na digestibilidade dos minerais, por meio da diminuição do pH, já que aumentam a dissociação dos minerais, formando complexos quelatados, que são mais facilmente absorvidos (RAVINDRAN; KORNEGAY, 1993).

A eficácia de um ácido em inibir microrganismos patogênicos depende do seu potencial de dissociação (pKa) e do pH do meio (PARTANEN; MROZ, 1999). Quando o pH intestinal estiver superior ao pKa desses ácidos, eles permanecem na forma dissociada, sendo essa pouco absorvida pelas células do trato gastrointestinal. Isto provoca redução do pH do meio e propicia a eliminação de bactérias que não toleram meios ácidos (MODINA et al., 2019). Por outro lado, quando estão na forma não dissociada, os ácidos orgânicos são lipofílicos e podem se difundir através da membrana do microrganismo (BOOTH; STRATFORD, 2003). Quanto menor o pH externo, mais a forma não dissociada atravessa a membrana. Quando no citoplasma, onde o pH é próximo ao neutro, os ácidos se dissociam, liberando prótons que acidificam o meio e acabam por suprimir o sistema enzimático, o transporte de nutrientes, a energia e a síntese de DNA do microrganismo, até o esgotamento total da bactéria (FRANCO, 2009). Esta ação antimicrobiana também interfere na saúde das células e integridade intestinal, pois a maior presença de microrganismos no trato digestivo propicia 1) o aumento na competição por nutrientes, 2) a descamação das células e 3) a secreção de muco pelas células caliciformes (APAJALAHTI, 2005).

Os ácidos graxos de cadeia curta são considerados agentes tróficos (DIBNER; BUTTIN, 2002). Contribuem para o desenvolvimento dos enterócitos, propiciando um aumento dos vilos e microvilosidades intestinais e, conseqüentemente, maior absorção de nutrientes (VAN IMMERSSEEL et al., 2004). Ainda, os ácidos orgânicos reduzem a carga de minerais eliminados por meio das fezes, devido a melhor digestibilidade e absorção, refletindo na qualidade da água do meio de criação (TRAN et al., 2020).

Figura 7. Diferentes mecanismos de ação dos ácidos orgânicos.



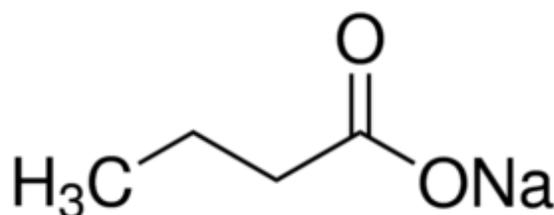
Fonte: elaborado pelo autor.

1.4.2 Ácido butírico e butirato de sódio

O ácido butírico ou butirato é um ácido graxo de cadeia curta (com quatro carbonos, C4), saturado e líquido em temperatura ambiente. Sua produção a nível industrial é exclusivamente via síntese química, utilizando-se matérias-primas da indústria petroquímica (JIANG et al., 2018). Entretanto, é produzido naturalmente no lúmen intestinal por bactérias anaeróbias, principalmente dos gêneros *Clostridium*, *Eubacterium*, *Butyrivibrio* e *Butyribacterium*, por meio da fermentação anaeróbica de resíduos endógenos ou dietéticos no intestino (BOAS, 2014). A presença do butirato no intestino, além beneficiar o crescimento dos animais (DAWOOD et al., 2020; LUZ et al., 2019) e o controle de patógenos, também possui propriedades anti-inflamatórias e efeitos sobre vários componentes da barreira intestinal (CANANI et al., 2011; HAMER et al., 2008), como as junções oclusivas (MITIC; VAN ITALLIE; ANDERSON, 2000). Seu sal solúvel, o butirato de sódio (C₄H₇ NaO₂) (Figura 3), muitas vezes é mais utilizado por se apresentar na forma sólida, ser estável e ter odor menos

intenso (BOAS, 2014). Considerado um importante fornecedor de energia, atua na proliferação, diferenciação das células epiteliais, inibição da apoptose celular e na modulação da microbiota, auxiliando na manutenção da integridade do epitélio intestinal (CLAUS; GÜNTNER; LETZGUSS, 2007; LU; ZOU; WANG, 2008; MAZZONI et al., 2008). Além disso, tem impacto benéfico na resposta imune e resistência a doenças (ABD EL-NABY et al., 2019; MIRGHAED et al., 2019).

Figura 8. Estrutura molecular do butirato de sódio.



Fonte: Sigma-Aldrich, 2020.

Melhorias no desempenho zootécnico, induzidas pela inclusão de butirato de sódio na dieta de peixes, foram relatadas em estudos realizados em tilápia-do-nilo (ABD EL-NABY et al., 2019; DAWOOD et al., 2020), pirarucu (*Arapaima gigas*) (LUZ et al., 2019) e pompano (*Trachinotus ovatus*) (ZHOU et al., 2019). O bom desempenho pode estar associado ao aumento na área de superfície de absorção intestinal, cujas pregas ficam maiores e mais largas, resultando na melhora da saúde intestinal (TRAN et al., 2020). Também foi relatado o aumento da atividade das enzimas digestivas do intestino, o que pode resultar em maior digestibilidade, absorção e utilização de nutrientes (LUZ et al., 2019; ZHOU et al., 2019). Dawood et al. (2020) e Luz et al. (2019) relataram que a suplementação com butirato de sódio nas concentrações de 1,0 e 1,5 g kg⁻¹ aumentaram a altura das pregas intestinais e o desempenho dos peixes. Já, Zhou et al. (2019) demonstraram que a inclusão de 2,0 g kg⁻¹ aumentou atividade da protease e amilase, bem como o ganho em peso e a eficiência alimentar dos peixes.

Além desses efeitos, outros estudos relatam que a utilização do butirato de sódio como aditivo alimentar melhora a resposta imunológica dos peixes. Foi relatado o aumento de importantes índices imunológicos inespecíficos, como atividade das lisozimas, do sistema complemento, fagocítica e bactericida, atuando na eliminação de microrganismos patogênicos (ABD EL-NABY et al., 2019; MIRGHAED et al., 2019). A defesa contra diferentes estressores também pode ser melhorada com a suplementação de butirato de sódio pelo aumento do número de células caliciformes (DAWOOD et al., 2020). A produção de muco por estas células permite a formação de uma camada que cobre a superfície do epitélio intestinal, protegendo a mucosa

da desidratação, de danos e bactérias patogênicas (PIRARAT et al., 2015) devido as suas propriedades mecânicas (reduz a aderência dos patógenos) e bioquímicas (ação de lisozimas e proteases) (GUARDIOLA et al., 2014). Isto resulta em maior sobrevivência ao estresse térmico (DAWOOD et al., 2020) e a infecções bacterianas por *Aeromonas hydrophila* (ABD EL-NABY et al., 2019) e *Streptococcus iniae* (MIRGHAED et al., 2019).

A resposta inflamatória no intestino é um importante componente que, associado à barreira física e a componentes químicos e celulares, protege de possíveis infecções de patógenos. As citocinas são reguladores chave do sistema imunológico e participam da proliferação e diferenciação de células imunológicas (MIRGHAED et al., 2019). De acordo com Mirghaed et al. (2019), na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a suplementação dietética de butirato de sódio apresentou efeitos anti-inflamatórios, por meio da regulação da expressão das citocinas IL-1 β , TNF- α , TGF- β e IL-10, consideradas mediadores da resposta inflamatória e importantes indicadores da saúde intestinal (MULDER; WADSWORTH; SECOMBES, 2007).

A administração de butirato de sódio também influencia na saúde intestinal por meio da mitigação da inflamação da mucosa e do estresse oxidativo, resultando na melhoria da barreira do epitélio intestinal (HAMER et al., 2008). Esta barreira é composta pelo muco, células epiteliais e pelas junções intercelulares. Estas são estruturas de membrana que conectam as células epiteliais umas às outras, sendo as junções oclusivas as de maior destaque, pois atuam diretamente na manutenção da integridade do epitélio, regulando a passagem de íons, macromoléculas e substâncias indesejáveis pela via paracelular (CAMPBELL; MAIERS; DEMALI, 2017). A suplementação dietética com butirato de sódio em truta arco-íris em níveis acima de 2,5 g kg⁻¹ melhorou a barreira epitelial, por meio da regulação positiva da expressão gênica de algumas proteínas das junções oclusivas, como a claudina 3, ocludina e *zonula occluden 1* (ZO-1) (MIRGHAED et al., 2019). Assim como a regulação positiva na expressão de enzimas antioxidantes, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GHS-Px) (MIRGHAED et al., 2019), capazes de diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que destroem as proteínas das junções, evitando a interferência na estrutura do epitélio (ZHANG et al., 2013). Os efeitos da suplementação dietética do butirato de sódio em diferentes espécies de peixes, conforme estudos supracitados, estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2. Efeitos da utilização do butirato de sódio em diferentes espécies de peixes.

Espécie	Peso inicial	Tempo semanas	Butirato de sódio g kg ⁻¹	Principais respostas	Referência
	g				
Tilápia-do-nylo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	21,65	8	0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0	- ↑ GP, TCE e EA (dose ótima: 1,2). - Melhora na morfologia intestinal (AP, LP, CC) entre as doses 1,0 e 2,0. - ↑ índice fagocítico, atividades das lisozimas e fagocítica nas doses 1,5 e 2. - ↑ SOB ao estresse térmico em todos os tratamentos comparados ao controle. - ↑ GP e TCE na dose 5,0.	DAWOOD et al., 2020
Tilápia-do-nylo (<i>O. niloticus</i>)	5,50	12	0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0	- ↑ atividade das lisozimas de maneira dependente da dose. - Sem mortalidade nas doses 0,5 e 10,0, após desafio com <i>A. hydrophila</i> . - ↑ mortalidade nos peixes da dieta controle, após desafio (85,0%). - ↑ atividade das lisozimas e bactericida nas doses 2,5 e 5. - ↑ expressão gênica TNF- α na dose 5,0.	ABD EL-NABY et al., 2019
Truta arco-iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	34,97	6	0; 1,5; 2,5 e 5,0 ¹	- ↑ expressão de IL-1 β , IL-10 e TGF- α na dose 2,5. - ↑ CAT, SOD e GPx nas doses mais altas (2,5 e 5,0). - ↑ expressão da claudina-3, occludina e ZO-1 nas doses mais altas (2,5 e 5,0). - ↑ SOB na dose 5,0.	MIRGHAED et al., 2019
Pirarucu (<i>Arapaima gigas</i>)	132,07	6	0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0	- ↑ CA nas doses 0,5 e 1,0. - ↑ CP na porção anterior e média do intestino na dose 1,0. - ↑ atividade de amilase na maior dose.	LUZ et al., 2019
Pompano (<i>Trachinotus ovatus</i>)	6,91	8	0; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 e 4,0	- ↑ GP, TCE e EA na dose 2,0. - ↑ Atividade da protease e amilase na dose 2,0.	ZHOU et al., 2019

¹Butirato de sódio protegido.

AP: altura das pregas; CAT: catalase; CC: célula caliciforme; EA: eficiência alimentar; GP: ganho em peso; GPx: glutatona peroxidase; IL-1 β : interleucina 1 β ; IL-10: interleucina 10; LP: largura das pregas; SOB: sobrevivência; SOD: superóxido dismutase; TCE: taxa de crescimento específico; TGF- β : fator de transformação do crescimento β ; TNF- α : fator de necrose tumoral α ; ZO-1: zônula de oclusão 1.

1.4.3 Levedura

Leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, pertencentes ao reino Fungi, sendo a maioria da classe das Ascomycetes e Basidiomycetes. Caracterizadas como heterótrofos, fazem uso de material orgânico vivo e/ou morto como fonte de nutrientes e energia (BENNETT, 1998). São utilizadas mundialmente na fabricação de produtos alimentícios fermentados, como ingredientes melhoradores do sabor, aroma e textura, no enriquecimento nutricional de alimentos e bebidas, como também na redução de toxinas e compostos antinutricionais (RAI; PANDEY; SAHOO, 2019).

As grandes quantidades de biomassa de levedura são obtidas principalmente da fermentação da indústria cervejeira e das destilarias de etanol (HUYBEN et al., 2019). O Brasil é o maior produtor mundial de etanol, onde leveduras são empregadas como agente de fermentação, possuindo assim uma grande disponibilidade desse subproduto (ROCHA et al., 2008). As leveduras apresentam características muito favoráveis para cultivo em massa, tais como crescimento rápido, alto rendimento de biomassa, utilização de diferentes substratos, pouca exigência em área e água, além de produção independente dos fatores climáticos, já que é feita em tanques de fermentação controlados (YAMADA et al., 2010). Atualmente, há um interesse crescente na exploração dos resíduos e subprodutos dessas indústrias, tanto pelo grande volume produzido, como também pela formação de um produto de alto valor nutricional (AMORIM et al., 2016), tornando-se uma fonte de compostos bioativos para a produção de ingredientes alimentares (VIEIRA; CUNHA; FERREIRA, 2019). No entanto, as leveduras são utilizadas na nutrição animal há mais de 100 anos, por meio da inclusão nas rações, tanto de leveduras vivas, como de subprodutos de levedura ou de produtos comerciais fabricados especificamente para alimentação animal (STONE, 2006).

A composição das leveduras pode variar de acordo com a espécie, aeração, substrato, secagem e tratamento utilizado no meio de cultura. Segundo Pardo-Gamboa et al. (2011), a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, espécie mais utilizada em aditivos, são compostas em média por: 93,83% matéria seca; 4554 kcal kg⁻¹ de energia bruta; 38,85% de proteína bruta; 0,84% de extrato etéreo; 1,26% de fibra bruta; 3,81% de matéria mineral; 0,51% de cálcio e 0,88% de fósforo. Leveduras são subprodutos altamente ricos em proteínas com ótimo balanço de aminoácidos essenciais, principalmente lisina e treonina (VANANUVAT, 1977; YOUSRI, 1982), vitaminas, minerais e fibra dietética (REED; NAGODAWITHANA, 1991). Sua composição em aminoácidos é comparável a algumas farinhas de peixe (VANANUVAT, 1977) e até superiores ao farelo de soja (VANANUVAT, 1977; AJEANI et al., 1979) em teor de lisina.

O valor nutritivo das leveduras não se restringe somente ao seu teor proteico ou aminoácido, mas também por sua riqueza em vitaminas do complexo B, tais como tiamina (YOUSRI, 1982), niacina, riboflavina e colina (KRIDER et al., 1982); no entanto, são deficientes em vitamina B₁₂ (HANSSEN, 1981; YOUSRI, 1982). As leveduras são também relativamente ricas em cálcio (MOREIRA, 1984; FAZANO, 1986), potássio (MACHADO, 1983), ferro e zinco (FIALHO, 1985; MACHADO, 1983).

As leveduras são constituídas por estruturas imunoestimulantes, como β -glucanas (β G), mananoligossacarídeos (MOS), ácidos nucleicos e quitina (SHEIKHZADEH et al., 2012), caracterizando-as como um alimento funcional e eficaz, capaz de melhorar o estado imunológico e a saúde dos animais (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994).

De acordo com o processamento, pode-se obter levedura seca ou hidrolisada, bem como produtos à base de levedura, como o extrato de levedura, rico em ácidos nucleicos e nucleotídeos, componentes da parede celular numa combinação dessas frações. A levedura seca, que é a forma íntegra das células de levedura, é rica em aminoácidos, carboidratos e proteína bruta (ZANUTTO, 1997). No entanto, a resistência da sua parede celular à ação das enzimas digestivas, em monogástricos, pode ser o principal responsável pela diminuição da digestibilidade e o baixo valor nutritivo das leveduras intactas, pois esta parede dificulta a utilização das proteínas e outros nutrientes presentes no citoplasma (VANANUVAT, 1977). Já a levedura hidrolisada, devido ao processo de ruptura da parede celular por ação enzimática exógena (proteases e nucleases) ou mecânica, expõe o citoplasma completamente, disponibilizando seu conteúdo celular rico em aminoácidos, vitaminas, minerais e componentes da parede celular (HUIGE, 2006). Além disso, o hidrolisado é um aditivo alimentar interessante, por possuir alta taxa de digestão e absorção, melhorando a eficiência alimentar, favorecendo o crescimento e o sistema imunológico, promovendo assim a saúde dos peixes (TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020).

Com os avanços nas pesquisas voltadas aos aditivos alimentares, diversas formas de leveduras e derivados estão sendo avaliados para a nutrição animal, tanto na forma de leveduras probióticas, como frações de leveduras (paredes celulares, extratos de leveduras) ou como produtos purificados nutracêuticos, tais como os nucleotídeos, β -glucanas e mananoligossacarídeos, que proporcionam efeitos benéficos no desempenho e saúde animal (SHURSON, 2018).

1.4.3.1 Nucleotídeos

Os nucleotídeos são moléculas compostas por uma base nitrogenada (purina ou pirimidina) ligada a uma pentose, com pelo menos um grupo fosfato (NELSON; COX, 2014). Nutricionalmente, não são considerados nutrientes essenciais, pois são sintetizados endogenicamente pelo organismo (GRIMBLE; WESTWOOD, 2000). No entanto, podem ser considerados semi-essenciais, em situações em que o organismo necessita de quantidades maiores do que é capaz de sintetizar (ROSSI; XAVIER; RUTZ, 2007).

O organismo possui duas formas de obtenção dos nucleotídeos, uma pela via de síntese *de novo* e outra por salvamento (ROSSI; XAVIER; RUTZ, 2007). A via síntese *de novo* utiliza os precursores metabólicos: aminoácidos, ribose-5-fosfato, CO₂ e NH₃ para formação dos nucleotídeos, ocorrendo no citosol do hepatócito, local onde estão disponíveis as enzimas para a síntese das purinas e pirimidinas (ROSSI; XAVIER; RUTZ, 2007). Já a via de salvamento obtém os nucleotídeos por meio da fosforilação de um grupo fosfato com nucleosídeos resultantes da quebra dos nucleotídeos fornecidos por meio da dieta (LERNER e SHAMIR, 2000), também no citosol dos hepatócitos. Essa via é de grande importância e preferencialmente utilizada por tecidos de rápida proliferação, como o intestino e o sistema imunológico, bem como em resposta a agentes estressores, devido ao alto gasto de energia demandado pela via síntese *de novo* e sua capacidade limitada de produção (GIL, 2002).

Os nucleotídeos participam de vários processos bioquímicos que são essenciais para o funcionamento do organismo (NELSON; COX, 2014), atuam como precursores de moléculas carreadoras de material genético (DNA e RNA), são fonte de energia, atuam como componente em coenzimas (NAD⁺, NADP⁺, FAD, CoA), proteínas, lipídios e vitaminas. Também são nutrientes essenciais na construção celular, bem como no desenvolvimento e reparo tecidual (TIE et al., 2019). Além disso, os nucleotídeos dietéticos influenciam na atividade fagocítica (GIL, 2002), na atividade das lisozimas (SAKAI et al., 2001) e das imunoglobulinas, na ativação e proliferação de linfócitos, bem como no aumento da produção de citocinas, principalmente no intestino (GIL, 2002).

Os nucleotídeos estão presentes em alimentos de origem vegetal e animal, na forma de nucleotídeos livres e ácidos nucleicos; entretanto, a concentração de DNA e RNA varia principalmente de acordo com a densidade celular do alimento de origem (GIL, 2002). Usados como ingredientes funcionais nas rações, são frequentemente suplementados na forma de extratos de levedura ou como nucleotídeos purificados (SAUER et al., 2012). Em aquicultura, os nucleotídeos primeiramente foram utilizados amplamente como aditivos alimentares para

melhorar a palatabilidade das rações, atuando como intensificadores do sabor (CARR; NETHERTON; MILSTEAD, 1984; ISHIDA; HIDAKA, 1987). Entretanto, atualmente os nucleotídeos exógenos, advindos da dieta, têm se mostrado promissores aditivos alimentares pelos múltiplos efeitos no trato gastrointestinal e crescimento, influenciando em múltiplas características fisiológicas e morfológicas, além de promover a melhora de parâmetros imunológicos e consequente diminuição na susceptibilidade a doenças em organismos aquáticos (LI; GATLIN, 2006).

Estudos com diferentes espécies de peixes, como tilápia-do-nilo (ASADUZZAMAN et al., 2017), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (KEYVANSHOKOOH; TAHMASEBI-KOBYANI, 2012; TAHMASEBI-KOBYANI et al., 2011), carpa capim (*Ctenopharyngodon idellus*) (TIE et al., 2019) e o pargo-japonês (*Pagrus major*) (HOSSAIN et al., 2016) mostraram que a suplementação dietética de nucleotídeos resultou na melhora dos parâmetros de crescimento, como ganho em peso, taxa de crescimento específico e eficiência alimentar. Além disso, em juvenis de tilápia-do-nilo observou-se que a expressão de genes relacionados ao crescimento, como MyoD, IGF-1, GH, GHR-1, também foi aumentada com sua suplementação (ASADUZZAMAN et al., 2017).

Em relação aos benefícios no trato gastrointestinal mediante a suplementação de nucleotídeos, ressalta-se aumento na altura das pregas intestinais, bem como das microvilosidades em *red drum* (*Sciaenops ocellatus*) (CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011). Já no paulistinha (*Danio rerio*) houve melhora em dois componentes da barreira física intestinal: aumento na expressão do gene da mucina e das junções oclusivas, claudina-15 e ocludina (GUO et al., 2019).

A suplementação dietética de nucleotídeos foi capaz de modular positivamente o sistema imunológico da tilápia-do-nilo, via respostas celulares tanto inespecíficas (aumento da contagem de leucócitos) quanto específicas (aumento da contagem de linfócitos) (REDA et al., 2018). Já na truta arco-íris, a modulação ocorreu via resposta inespecífica humoral, com o aumento da atividade das lisozimas e o acréscimo nas proteínas responsáveis pelo sistema complemento (TAHMASEBI-KOBYANI et al., 2011). Adicionalmente, os nucleotídeos exógenos aumentaram positivamente a expressão gênica das citocinas intestinais TGF- β , IL-1 β , IL-10 e TNF- α em tilápia-do-nilo (REDA et al., 2018). Por fim, devido à melhora nas respostas imunológicas, a suplementação de nucleotídeos influenciou positivamente na diminuição da susceptibilidade da truta arco-íris à infecção por *Aeromonas sobria* (TAHMASEBI-KOBYANI et al., 2011) e, da tilápia-do-nilo, por *Streptococcus iniae* (REDA et al., 2018).

1.4.3.2 Parede celular

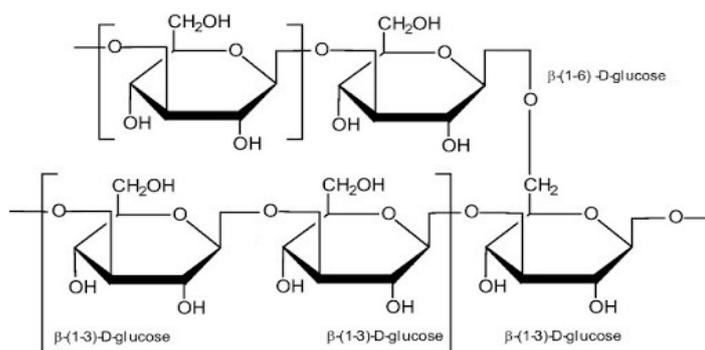
A parede celular representa cerca de 15 a 20% da matéria seca total das células de levedura (HOUGH, 1990; ROSE, 1993; SHURSON, 2018), composta principalmente por β G, MOS e quitinas, ligadas entre si por ligações covalentes (CABIB; ROBERTS; BOWERS, 1982). Os efeitos benéficos das leveduras estão associados principalmente aos componentes estruturais da sua parede celular.

Os β G e os MOS são os principais componentes da parede das leveduras, considerados prebióticos, suplementados na dieta de peixes individualmente ou em combinação (GUERREIRO et al., 2016; SHURSON, 2018). Estes compostos atuam na redução da carga de bactérias patogênicas, favorecendo o crescimento da microbiota intestinal benéfica e a produção dos seus subprodutos, regulando positivamente o sistema imunológico, promovendo a absorção de nutrientes e a saúde intestinal (GUERREIRO et al., 2016).

1.4.3.2.1 β -glucanas

As β G são quimicamente conhecidas como polissacarídeos não amiláceos, encontrados na camada de aleurona de cereais (trigo, centeio, cevada e aveia), nas frutificações dos cogumelos e na parede celular de leveduras (gênero *Saccharomyces* e *Echinacea*), fungos (*Agaricus subrufescens* e *Cryptococcus neoformans*), bactérias e algas (*Laminaria sp.*) (SIRIMANAPONG et al., 2015). Especificamente, β G oriundas da parede celular da levedura são polímeros de glicose conectados por ligações glicosídicas β -1,3 e β -1,6 (Figura 4) (ROBERTSEN; ENGSTAD; RAA, 1990). São utilizadas na nutrição animal como prebióticos imunoestimulantes, por sua capacidade de modular vários componentes do sistema imunológico e, conseqüentemente diminuir a susceptibilidade aos patógenos (DALMO; BØGWALD, 2008). O efeito imunoestimulante das β G se explica por serem estruturas químicas abundantes em comunidades microbianas, definidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são moléculas de alarme, que ativam o sistema imunológico (DALMO; BØGWALD, 2008). Então, por meio da interação com os diferentes receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), presentes nas células do sistema imune, ocorre o reconhecimento dos PAMPs, que induzem uma cascata de sinalização intracelular.

Figura 9. Estrutura molecular da β G de levedura.



Fonte: Rahar, 2011.

Há a ativação dos leucócitos, que estimulam a atividade fagocítica, citotóxica e antimicrobiana, bem como a produção de mediadores inflamatórios que fornecem proteção eficaz contra patógenos oportunistas (ROBERTSEN; ENGSTAD; JORGENSEN, 1994). De acordo com Dalmo e Bøgwald (2008), existem diferentes PRRs com capacidade de se ligarem às β G, como dectina-1, receptor do sistema complemento 3 (CR3), receptores *toll-like* (TLR), lactosilceramida e receptores sequestradores (SR).

A dectina-1, pertencente à família das lectinas do tipo C, é considerada o principal receptor de β G (DENNEHY; BROWN, 2007). Expressado por várias células imunes, principalmente em macrófagos, seguido por neutrófilos, eosinófilos, monócitos, células natural killers (NK) e, em menor grau, células dendríticas e algumas células T (BROWN; GORDON, 2003; DRUMMOND; BROWN, 2011). O reconhecimento das β G, principalmente por esse receptor, melhora diversos parâmetros imunológicos, como a fagocitose, degranulação de neutrófilos, explosão oxidativa respiratória, produção de mediadores lipídicos inflamatórios e citocinas, que recrutam e coordenam a ativação de outras células da resposta inflamatória (DRUMMOND; BROWN, 2011; MEENA et al., 2013). Além disso, a suplementação das β G promove um aumento de parâmetros humorais da imunidade inespecífica, como atividade das lisozimas, sistema complemento e bactericida (BAGNI et al., 2005; PAULSEN; ENGSTAD; ROBERTSEN, 2001).

A administração das β G por via entérica demonstrou ser eficiente, sendo possível verificar em diferentes espécies uma diminuição à susceptibilidade a doenças, como em tilápia-do-nylo exposta a *Streptococcus agalactiae* (PILARSKI et al., 2017), *Aeromonas hydrophila* e *Flavobacterium columnare* (AMPHAN et al., 2019); em truta arco-íris, à *Aeromonas salmonicida* (JI et al., 2017); em carpa koi (*Cyprinus carpio koi*), à *Aeromonas veronii* (LIN et al., 2011); em carpa indiana (*Labeo rohita*), à *Aeromonas hydrophila* e *Edwardsiella tarda* (MISRA et al., 2006) e no bacalhau do Atlântico (*Gadus*

morhua), ao *Vibrio anguillarum* (LOKESH et al., 2012). A diminuição na susceptibilidade à infecção por patógenos dessas espécies está relacionado diretamente à melhoria das respostas imunológicas inespecíficas, com acréscimo da atividade fagocítica (AMPHAN et al., 2019; MISRA et al., 2006), aumento da concentração das lisozimas (AMPHAN et al., 2019; JI et al., 2017; MISRA et al., 2006), acréscimo da ação bactericida e do sistema complemento (AMPHAN et al., 2019; MISRA et al., 2006), aumento da explosão respiratória (JI et al., 2017; PILARSKI et al., 2017) e aumento do título aglutinante de anticorpos (MISRA et al., 2006). Adicionalmente, foi relatado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-8 e uma redução na expressão de citocinas anti-inflamatória IL-10, já que níveis muito altos dessa citocina podem suprimir a secreção de outras moléculas inflamatórias, facilitando a proliferação do patógeno (LOKESH et al., 2012).

A suplementação das β G em dietas para peixes também pode influenciar positivamente nos parâmetros de crescimento conforme relatado para tilápia-do-nylo (PILARSKI et al., 2017), truta arco-íris (JI et al., 2017), carpa espelho (*Cyprinus carpio* L.) (KÜHLWEIN et al., 2014) e pargo-japonês (*Pagrus major*) (DAWOOD et al., 2017). Até o presente, ainda não é conhecido o mecanismo que proporciona maior crescimento quando β G são suplementadas na dieta, sendo esse efeito positivo relatado em algumas espécies, mas não em outras. De acordo com Dalmo e Børgwald (2008) a melhora no crescimento induzida pelas β G, pode estar relacionada a uma melhor resposta imunológica intestinal que, por sua vez, leva à diminuição da susceptibilidade a patógenos, o que afetaria a absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento.

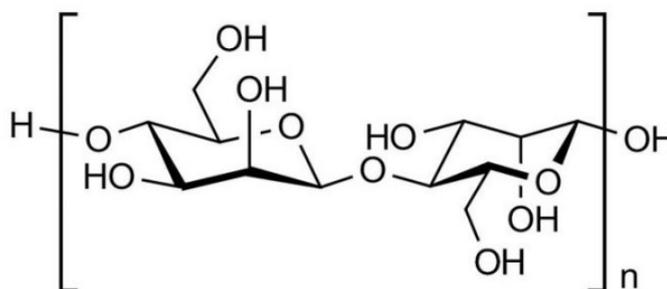
Por fim, há relatos que as β G atuam positivamente sobre o epitélio intestinal da carpa espelho, por meio do aumento na altura e densidade das microvilosidades (KÜHLWEIN et al., 2013) e na manutenção da permeabilidade paracelular, evitando a passagem de moléculas indesejadas pelos espaços intercelulares, por meio do aumento na expressão gênica da proteína da junção ocludina, em juvenis de gar tropical (*Atractosteus tropicus*) (NIEVES-RODRÍGUEZ et al., 2018). Estas melhoras sugerem que as β G ajudam no desenvolvimento e manutenção da integridade do epitélio intestinal, refletindo em provável melhora na utilização dos nutrientes.

1.4.3.2.2 Mananoligossacarídeos - MOS

Diferente das β G, os MOS são complexos polissacarídicos compostos por pequenos polímeros de manose, unidos por ligações α -1, 6, e cadeias laterais, por α -1, 2 e α -1, 3 (Figura 5), representando 40% da matéria seca da parede celular de leveduras (SINGH; SINGH; ARYA, 2018). Os mananos podem ser compostos somente por mananos, como também podem

estar associados a moléculas de glicose e/ou galactose, formando assim os glucomananos, galactomananos e galactoglucomananos (LIEPMAN et al., 2007). Os MOS são compostos bioativos que atuam como prebióticos melhoradores do equilíbrio da microbiota intestinal, preservando a integridade e a funcionalidade do intestino, modulando a resposta imune e melhorando a eficiência alimentar e, conseqüentemente, o crescimento dos peixes (AKTER et al., 2016; HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019).

Figura 10. Estrutura molecular do MOS de levedura.



Fonte: Elicityl, 2020.

A modulação seletiva da microbiota, promovida pelos MOS, se dá por estes apresentarem a capacidade de aglutinar bactérias patogênicas (GÜLTEPE et al., 2011). Estes compostos disponibilizam sítios de ligações ricos em manose, semelhantes aos encontrados nos enterócitos, que são exclusivos para bactérias gram negativas, que possuem fimbrias específicas de manose (OYOFO et al., 1989). A afinidade entre os sítios de ligação dos MOS, adicionados à dieta, proporciona uma diminuição da fixação dos patógenos nos enterócitos, facilitando sua expulsão pelo bolo fecal e evitando sua colonização no trato digestivo (FLEMMING, 2005). Em peixes alimentados com MOS, a modulação da microbiota foi evidenciada pela diminuição de bactérias nocivas, como *Aeromonas hydrophila* e *Escherichia coli*, bem como pelo aumento de bactérias benéficas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, em exemplares da carpa capim (LU et al., 2020). No panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (AKTER et al., 2016) e na carpa comum (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015) houve incremento das bactérias ácido-láticas, após suplementação dietética com MOS.

A diminuição da formação de colônias de bactérias nocivas que competem por nutrientes e/ou infectam os enterócitos, resulta na redução da produção de toxinas bacterianas, as quais interferem na estrutura da barreira intestinal, aumentando a translocação bacteriana (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014), devido aos danos causados nos enterócitos e nas estruturas das junções celulares (RINGØ et al., 2007). Adicionalmente, a maior disponibilidade de nutrientes beneficia o desenvolvimento morfológico e melhora a

integridade da mucosa intestinal (AZEVEDO et al., 2016; DIMITROGLOU et al., 2009; PELICANO et al., 2005). Estes efeitos foram relatados em estudos sobre suplementação dietética com MOS, onde houve melhora da morfologia intestinal, com o aumento da altura (AKTER et al., 2016; HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019; REN et al., 2020; TORRECILLAS et al., 2011) e da largura das pregas intestinais (AKTER et al., 2016; REN et al., 2020; TORRECILLAS et al., 2011). Da mesma forma, tal suplementação aumentou a altura (AKTER et al., 2016; DIMITROGLOU et al., 2009; TORRECILLAS et al., 2013) e a densidade das microvilosidades (DIMITROGLOU et al., 2011), quando avaliada a microestrutura celular por meio de microscopia eletrônica. Maiores densidades das microvilosidades podem reduzir a exposição das junções oclusivas entre os enterócitos, fornecendo uma barreira mais eficaz contra possíveis patógenos (STANDEN et al., 2015).

O uso de MOS como imunomodulador beneficia o hospedeiro por aumentar diversos parâmetros da imunidade inata (CARBONE; FAGGIO, 2016). Basicamente, o reconhecimento desse composto ocorre por meio de receptores de manose, expressos por macrófagos e células endoteliais que, quando ativados, desencadeiam uma reação em cascata, acionando principalmente os macrófagos, a fagocitose e a liberação de citocinas (COLLETT, 2000). Outro mecanismo de ação dos MOS no sistema imunológico se dá por meio da proteína chamada lectina de ligação à manose (MBL) (TORRECILLAS et al., 2007), a qual, quando ligada ao MOS, ativa o sistema complemento pela via das lectinas (NIKOLAKOPOULOU; ZARKADIS, 2006).

Em peixes, há relatos sobre benefícios no sistema imunológico com a suplementação dietética de MOS. Houve melhora em parâmetros-chaves do sistema inespecífico, tais como aumento da atividade das lisozimas e das imunoglobulinas em pangá híbrido (*P. gigas* × *P. hypophthalmus*) (HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019). Melhora em índices das lisozimas, atividade do sistema complemento e das imunoglobulinas (MOMENI-MOGHADDAM et al., 2015) na carpa comum (*Cyprinus carpio*), assim como na carpa cruciana (*Carassius auratus gibelio*) com aumento da atividade das lisozimas (LIU et al., 2013). E por fim, na garoupa híbrida (*E. lanceolatus* × *E. fuscoguttatus*) com aumento da atividade do sistema complemento e lisozimas (REN et al., 2020). Refletindo positivamente na diminuição da susceptibilidade à infecção por patógenos, como na carpa cruciana quando exposta a *Aeromonas hydrophila* (LIU et al., 2013), no catfish híbrido exposto a *Edwardsiella ictaluri* (HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019) e garoupa híbrida exposta ao *Vibrio harveyi* (REN et al., 2020).

Todos os benefícios citados acima, podem estar associados a melhores resultados zootécnicos encontrados com a suplementação dietética com MOS. Estudos com carpa capim (LU et al., 2020), panga (AKTER et al., 2016), dourada (*Sparus aurata*) (GÜLTEPE et al., 2011) e robalo asiático (*Lates calcarifer*) (ALI et al., 2017) evidenciaram maior ganho em peso e eficiência alimentar com a utilização desse prebiótico. Além desses benefícios, a dourada apresentou maior eficácia na digestibilidade das proteínas, carboidratos e energia, importantes na transformação dos nutrientes ingeridos em ganho de biomassa (GÜLTEPE et al., 2011).

1.4.3.3 Levedura hidrolisada

Diante do exposto, a suplementação dietética da levedura na sua forma hidrolisada, a qual engloba os nucleotídeos e os polissacarídeos da parede, além de algumas vitaminas e minerais; pode proporcionar um ótimo estado fisiológico, por meio das múltiplas interações desses componentes com o organismo dos peixes (CHEN et al., 2019; HE et al., 2009; TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020; ZHOU et al., 2018).

Particularmente em tilápia-do-nilo, a suplementação dietética de leveduras na forma hidrolisada beneficiaram o crescimento em termos de ganho em peso e eficiência alimentar (CHEN et al., 2019; TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020), além de aumentarem a altura das pregas (CHEN et al., 2019), o que pode estar associado a maior eficiência na absorção dos nutrientes e, conseqüentemente, melhor crescimento.

Além dos efeitos no desempenho e na morfologia intestinal, a utilização da levedura hidrolisada melhora o equilíbrio da microbiota intestinal, por meio do favorecimento do crescimento de bactérias benéficas em detrimento das enteropatogênicas em tilápia híbrida (*O. niloticus* × *O. aureus*) (HE et al., 2009) e em *black bass* (*Micropterus salmoides*) (ZHOU et al., 2018), quando alimentados com qualquer dose desse prebiótico.

Por fim, tanto na tilápia-do-nilo como no seu híbrido evidencia-se o efeito positivo da suplementação dietética de leveduras hidrolisadas no sistema imunológico, por meio de melhorias em elementos importantes desse sistema, tais como a atividade das lisozimas (CHEN et al., 2019; HE et al., 2009; TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020), a atividade fagocítica (HE et al., 2009), o sistema complemento (CHEN et al., 2019; HE et al., 2009), bem como no aumento da imunoglobulina e citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias (TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020). Adicionalmente, beneficiou a capacidade antioxidante dos peixes, por meio do aumento na atividade das enzimas CAT, SOD e glutathiona

peroxidase (GPx); reduzindo a malondialdeído (MDA) (CHEN et al., 2019; TIMOTHÉE ANDRIAMI ALINIRINA et al., 2020).

Os estudos mencionados acima sobre os efeitos da suplementação dietética de levedura hidrolisada em peixes estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Efeitos da suplementação dietética de levedura hidrolisada em diferentes espécies de peixes.

Espécie	Peso inicial g	Tempo semanas	Levedura hidrolisada g kg ⁻¹	Principais respostas	Referência
Tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	3,50	8	0; 10,0 e 30,0	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ no GP e EA na dose 10,0. - ↑ atividade das lisozimas na dose 30,0. - ↑ índices de imunoglobulina total nas doses 10,0 e 30,0. - ↑ expressão de IL-1β e IL-10 na dose 10,0. - ↑ expressão de TGF-β e TNF-α nas doses 10,0 e 30,0. - ↑ das enzimas antioxidantes SOD e GPx nas doses 10,0 e 30,0. - ↑ da enzima antioxidante CAT a 1% e ↓ MDA na dose 10,0. - ↑ EA na dose 10,0. 	TIMOTHÉE ANDRIAMI ALINIRINA et al. (2020)
Tilápia-do-nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	19,10	8	0; 1,25; 2,5; 5,0 e 10	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ AP intestinais na dose 10,0. - ↑ atividade das lisozimas nas doses 2,5 e 10,0. - ↑ sistema complemento nas doses 5,0 e 10,0. - ↑ enzimas antioxidantes nas doses entre 2,5 a 10,0. - ↓ mortalidade após desafio com <i>Streptococcus iniae</i> em todas as doses suplementadas. - Menor mortalidade após desafio na dose 10,0. - ↑ atividade das lisozimas na dose 0,25. 	CHEN et al. (2019)
Tilápia híbrida (<i>O. niloticus</i> × <i>O. aureus</i>)	50,88	8	0; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ sistema complemento na dose 0,5. - ↑ atividade fagocítica na dose 0,5 e 1,0. - ↑ bactérias benéficas e ↓ das potencialmente prejudiciais com a suplementação. - ↓ a diversidade da microbiota intestinal em todas as doses suplementadas. 	HE et al. (2009)
<i>Blaesotilapia</i> (<i>Micropterus salmoides</i>)	33,95	8	0; 1,0 e 2,0	<ul style="list-style-type: none"> - ↑ abundância de bactérias benéficas e ↓ das nocivas em todas as doses suplementadas. - ↓ abundância de cianobactérias na dose 2,0. - ↑ <i>Cetobacterium</i> e ↓ bactérias do gênero <i>Mycobacterium</i> com 2,0. 	ZHOU et al. (2018)

AP: altura das pregas; CAT: catalase; EA: eficiência alimentar; GHS-Px: glutatona peroxidase; GP: ganho em peso; IL-1β: Interleucina 1β; IL-10: interleucina 10; MDA: malondialdeído; SOD: superóxido dismutase; TGF-β: fator de transformação do crescimento β; TNF-α: fator de necrose tumoral α; TCE: taxa de crescimento específico.

1.4.4 Zinco

O zinco (Zn) é um metal leve, de cor azulada, sendo um cátion bivalente (MCDOWELL, 2003). Desempenha um papel fundamental como componente estrutural, catalítico e de sinalização em diversos processos fisiológicos (KIMURA; KAMBE, 2016). Considerado um oligoelemento essencial na proliferação celular e nos sistemas de reparo (MICHIELAN; D'INCÀ, 2015). Além disso, está envolvido em inúmeras vias metabólicas (TAN; MAI, 2001), por ser um cofator indispensável em inúmeras reações enzimáticas, incluindo a síntese e a degradação de proteínas e lipídios (VALLEE; FALCHUK, 1993). Nos peixes teleósteos, dentre os microminerais essenciais, o Zn é o segundo elemento com maior importância nutricional (BURY; WALKER; GLOVER, 2003).

O zinco atua diretamente no processo de crescimento, já que diversas enzimas presentes na replicação do DNA, transcrição do RNA e na síntese proteica são dependentes de dele (MACDONALD, 2000). Influencia na divisão celular, por meio da regulação do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), gerindo a proliferação celular (MACDONALD, 2000). Além disso, a suplementação de zinco inibe a apoptose das células (BALTACI; YUCE; MOGULKOC, 2018). O zinco desempenha um papel vital no desenvolvimento e funcionamento do intestino, por meio da participação na proliferação, renovação e reparo das células epiteliais, mantendo assim a correta estrutura e função da barreira intestinal (HU et al., 2013). A deficiência desse elemento na dieta pode afetar o crescimento celular e desmontar as proteínas das junções oclusivas, levando a disfunção da barreira intestinal (FINAMORE et al., 2008). Alterações na integridade dessa barreira estão associadas à inflamação intestinal e a várias doenças gastrointestinais (CAMILLERI et al., 2012). Em estudos com animais, a suplementação de zinco é amplamente usada para melhorar o desempenho, diminuir a permeabilidade e aliviar a inflamação intestinal (ZHANG et al., 2012; ZHANG; GUO, 2009).

No sistema imunológico, o zinco tem importância crucial, pois a leve deficiência resulta em defeitos generalizados na imunidade inata e adaptativa (KEHL-FIE; SKAAR, 2010). Envolvido no processo de proliferação das células imunológicas, possui a capacidade de interferir na atividade das células *natural killer*, na ação citolítica das células-T, no processo de fagocitose de macrófagos e neutrófilos (SALGUEIRO et al., 2000) e na maturação dos linfócitos B (CRUZ; SOARES, 2011). Por fim, o zinco é um dos nutrientes mais importante para o adequado funcionamento do sistema antioxidante, por ser componente essencial da

enzima SOD e na manutenção da concentração correta das metalotioneínas (MTs), que também são importantes eliminadoras de radicais livres (TAPIERO; TEW, 2003).

Em trabalhos com tilápia-do-nilo (HUANG et al., 2015), carpa Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) (TAN et al., 2011) e carpa capim (SONG et al., 2017; WU et al., 2015) foi demonstrado que a adição deste mineral nas dietas melhorou o desempenho produtivo dos peixes, mostrando a essencialidade do Zn para o máximo crescimento e eficiência alimentar. Associado a essas melhorias, a utilização desse oligoelemento beneficiou também a atividade das enzimas digestivas (tripsina, quimotripsina, lipase e amilase), favorecendo a digestão dos alimentos, o que refletiu diretamente no melhor desempenho dos peixes (TAN et al., 2011).

Estudos também relatam vários efeitos positivos sobre o sistema antioxidante dos peixes, por meio da regulação de inúmeras enzimas em espécies como tilápia-do-nilo (HUANG et al., 2015), carpa Jian (TAN et al., 2011) e carpa capim (SONG et al., 2017). Em relação ao sistema imunológico, também é relatado melhorias em elementos chaves, por meio do aumento da atividade das lisozimas e do sistema complemento (SONG et al., 2017). Entretanto, quando há deficiência desse elemento nas dietas, observa-se a regulação positiva das citocinas pró-inflamatórias e a regulação negativa das anti-inflamatórias, sugerindo que sua deficiência possa acentuar a inflamação intestinal em peixes (SONG et al., 2017).

Atualmente, acredita-se que o crescimento dos peixes está intimamente relacionado à integridade do epitélio intestinal (REFSTIE et al., 2010). Estudos anteriores mostraram que a deficiência de zinco causou atrofia do intestino e reduziu a altura das pregas intestinais em juvenis da carpa Jian (TAN et al., 2011). Na carpa capim, análises histológicas evidenciaram maior inflamação intestinal, quando alimentadas com níveis baixos de zinco (SONG et al., 2017). Além da integridade do epitélio, a barreira física do intestino também desempenha um papel essencial para a saúde e desenvolvimento dos peixes (KARLSEN et al., 2003). A deficiência de zinco em dietas para carpa capim enfraqueceu a barreira física intestinal, devido à regulação negativa na expressão dos genes responsáveis por algumas junções oclusivas (SONG et al., 2017).

Esse mineral é administrado em dietas na forma inorgânica ou quelatado com proteínas ou aminoácidos, os quais são mais estáveis estruturalmente e apresentam maior biodisponibilidade em comparação aos seus sais inorgânicos (PARIPATANANONT; LOVELL, 1995). O produto resultante da quelatação apresenta 1) maior estabilidade em baixo pH, permitindo que o mineral seja disponibilizado somente no intestino; 2) maior capacidade de passar através da parede intestinal para a corrente sanguínea e 3) melhor absorção e metabolização dentro do organismo, por carregarem uma carga negativa (MILES; HENRY,

2000). Há relatos que as fontes orgânicas de zinco, como o proteinato de zinco, favorecem o crescimento, o sistema imunológico e antioxidante quando suplementadas em dietas para peixes e camarões (LIN et al., 2013; PARIPATANANONT; LOVELL, 1995).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivos Geral

Avaliar a morfologia intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo diferentes níveis do aditivo VILIGEN™.

1.5.2 Objetivos Específicos

Avaliar a morfologia e integridade intestinal, bem como identificar a presença e a localização de bactérias no intestino, por microscopia eletrônica.

Avaliar se as dietas afetam a barreira e permeabilidade intestinal através da quantificação da proteína transmembranar claudina-2.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo a seguir será submetido ao periódico *Aquaculture*.

O aditivo alimentar Viligen™ beneficia a morfologia e a integridade intestinal em juvenis de tilápia-do-nilo, mas não altera a barreira física intestinal.

Vitória Daitx de Oliveira¹, Jhonis Ernzen Pessini¹, Bruna Mattioni¹, Jacó Joaquim de Mattos¹, Afonso Celso Dias Bainy¹, James Eugene Pettigrew² & Débora Machado Fracalossi^{1*}

¹Departamento de Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Rodovia Admar Gonzaga, 1346, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

²Pettigrew Research Services, Inc., Champaign, IL, USA.

*Autor correspondente: debora.fracalossi@ufsc.br. Telefone: +55-48-3721-6300.

RESUMO

A ração é o insumo que mais onera o custo de produção na aquicultura; portanto, toda melhora na eficiência da sua utilização tem ampla repercussão no sistema produtivo. O uso de aditivos alimentares com propriedades moduladoras na imunologia e morfologia intestinal promovem melhor crescimento e recuperação de eventuais danos no sistema digestório, importante porta de entrada de patógenos. VILIGEN™ (Alltech®, EUA) é um aditivo alimentar composto principalmente por butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco com o propósito de melhorar a saúde e integridade intestinal dos animais. O objetivo deste estudo foi avaliar se a inclusão de VILIGEN™ melhora a morfologia, integridade e saúde intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*. Foi realizado um ensaio de dose-resposta, onde grupos de 28 peixes (peso médio inicial de 1,98 g) foram distribuídos em 30 unidades experimentais (200 L) pertencente a um sistema de recirculação, sendo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de inclusão de VILIGEN™ (0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg⁻¹), sendo cada nível testado em seis repetições. Possíveis alterações nos índices morfológicos e na estrutura da barreira física intestinal foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão ou pela quantificação da proteína claudina-2, por meio da técnica de *western blot*, respectivamente. O maior desenvolvimento e menor fusão das pregas intestinais também foram registradas nos peixes suplementados com 2,40 g kg⁻¹ de VILIGEN™. A análise morfológica demonstrou que as inclusões de 1,20 e 2,40 g kg⁻¹ do aditivo promoveram melhor integridade do tecido intestinal, sem a presença de deformidades ou lesões nas pregas intestinais. Já os peixes não suplementados e os suplementados com 4,80 g kg⁻¹ de VILIGEN™ apresentaram um maior número de lesões no tecido bem como maior deformidade e fusões das pregas. A suplementação dietética com VILIGEN™ resultou em maior altura das microvilosidades em comparação aos peixes não suplementados. A maior altura estimada das microvilosidades foi obtida com a inclusão de 2,50 g kg⁻¹ do aditivo alimentar. No entanto, a quantificação da proteína da junção claudina-2 não foi significativamente afetada pela suplementação. A utilização de 2,50 g kg⁻¹ do aditivo VILIGEN™ melhora os índices morfológicos e a integridade do epitélio do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo.

Palavras-chave: barreira intestinal, microvilosidades, *Oreochromis niloticus*, saúde intestinal, suplementação dietética.

2.1 INTRODUÇÃO

A tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) está no grupo das espécies de peixes de água doce mais criadas no mundo, superada apenas pelas carpas. A fácil adaptabilidade às diversas condições ambientais, alta taxa de crescimento e a resistência a enfermidades (EL-SAYED, 2020), associadas a tecnologias de produção bem estabelecidas, são características que justificam sua ampla criação. No entanto, para atender à demanda de alimentos da população mundial é necessário sistemas de produção mais eficientes. Com isso, a intensificação nos sistemas de produção na aquicultura promovem a ação de agentes estressores, que induzem imunossupressão, aumentam a susceptibilidade a infecções e enfermidades, levando a um decréscimo no desempenho produtivo (ADEOYE et al., 2016). Assim, melhorar e proteger a saúde intestinal dos peixes tornou-se um fator essencial à indústria aquícola (LI et al., 2017).

Em peixes, assim como em todos os vertebrados, a saúde intestinal depende da adequada função da barreira física intestinal, a qual está relacionada principalmente à integridade dos enterócitos e das junções oclusivas nela presentes (NIKLASSON, 2013). O intestino é um órgão com grande variedade de funções e enorme complexidade. Sua função clássica é a digestão dos alimentos ingeridos, seguido da absorção dos nutrientes (CELI et al., 2017). Além disso, é responsável por fornecer uma barreira física entre o lúmen intestinal e o meio intracelular (ALASSANE-KPEMBI; OSWALD, 2015), permitindo apenas a passagem dos nutrientes necessários e evitando a entrada de antígenos alimentares, patógenos, toxinas e fatores pró-inflamatórios que possam prejudicar o animal (ASSIMAKOPOULOS et al., 2018). Essa barreira física é composta por uma camada de células absorptivas, denominadas enterócitos, conectados entre si pelos complexos juncionais (JUTFELT, 2006). Associado aos enterócitos, na superfície apical, é encontrada uma densa camada de microvilosidades, que aumentam a produção de enzimas digestivas, a área de absorção (JUTFELT, 2006) e fornecem uma barreira eficaz contra patógenos (STANDEN et al., 2015). Os complexos juncionais são formados pelas junções oclusivas, seguido das junções aderentes e desmossomos (CELI et al., 2019). Dentre estas, as junções oclusivas têm maior destaque, pois formam uma barreira de dois tipos: 1) paracelular, responsável pela formação da barreira seletiva semipermeável de moléculas e 2) intramembranar, restringindo a troca de componentes entre o domínio apical e basolateral da membrana (ZIHNI et al., 2016). Entretanto, essa barreira é facilmente danificada, pela 1) ingestão de micotoxinas (STEWART; PRATT-PHILLIPS; GONZALEZ, 2017), 2) alterações na composição do muco (BISCHOFF et al., 2014) e 3) presença de microrganismos patogênicos e suas toxinas (O'HARA; BURET, 2008), promovendo aumento no tráfego de substâncias e moléculas

entre o lúmen intestinal e o meio intracelular, deixando o animal mais susceptível a organismos patogênicos (TRAN-NGOC et al., 2016).

Diante disso, o desenvolvimento de aditivos e terapias alternativas que otimizem a saúde intestinal de maneira eficaz e que também continuem proporcionando o melhor crescimento, saúde intestinal e diminuição da susceptibilidade a patógenos são de grande interesse atual para a indústria de rações (CELI et al., 2017). Estas substâncias que promovem a saúde intestinal englobam principalmente a classe dos ácidos orgânicos, aminoácidos, leveduras e subprodutos, minerais, probióticos e prebióticos (GOOSSENS, 2015).

O VILIGEN™ (Alltech®, EUA) é um aditivo alimentar, composto por butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco, desenvolvido com o propósito de melhorar a integridade e saúde intestinal e, conseqüentemente, o desempenho dos animais. O butirato de sódio é um sal derivado de um ácido orgânico de cadeia curta, que atua como fornecedor de energia, auxilia na proliferação e diferenciação das células epiteliais, inibição da apoptose celular e modulação da microbiota, além de atuar na manutenção da integridade do epitélio intestinal (CLAUS; GÜNTNER; LETZGUSS, 2007; MAZZONI et al., 2008). Já as leveduras são utilizadas na nutrição pelo alto teor de proteína, energia e micronutrientes, bem como pela presença de compostos nutracêuticos, como β -glucanas (β G), mananoligossacarídeos (MOS) e nucleotídeos (SHURSON, 2018), caracterizando-as como um alimento funcional e eficaz, melhorador do estado imunológico e da saúde intestinal (SIWICKI; ANDERSON; RUMSEY, 1994). Além disso, a sua forma hidrolisada possui alta taxa de digestão e absorção, potencializando seus efeitos benéficos (TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020). Por fim, o zinco é um oligoelemento essencial em dietas de peixes, atuando como promotor de crescimento, no sistema imunológico, na defesa contra danos oxidativos (KUMAR et al., 2017) e também sobre a proliferação, renovação e reparo das células epiteliais, mantendo a correta estrutura e função da barreira intestinal (HU et al., 2013).

A avaliação do efeito sinérgico da combinação de butirato de sódio, levedura hidrolisada e proteinato de zinco, presentes no VILIGEN™, sobre a morfologia e saúde intestinal ainda não foram testados em dietas para peixes. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes doses de VILIGEN™ sobre a morfologia e integridade intestinal da tilápia-do-nilo e sobre a permeabilidade intestinal, esta última por meio da quantificação da proteína transmembranar claudina-2.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Dietas experimentais

Cinco dietas experimentais foram formuladas com ingredientes práticos para atender às exigências nutricionais da espécie em estudo (FURUYA, 2010; NRC, 2011). As dietas, isonitrogenadas e isoenergéticas, continham níveis de inclusão crescentes de VILIGEN™: 0,00; 0,60; 1,20; 2,40 e 4,80 g kg⁻¹ de dieta (Tabela 4). Para manter a composição nutricional similar em todas as dietas, o aditivo alimentar entrou em substituição ao milho.

Tabela 4. Formulação e composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes ¹	Níveis de inclusão do VILIGEN™, g kg ⁻¹				
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
Milho	432,90	432,30	431,70	430,50	428,10
Farelo de soja	366,00	366,00	366,00	366,00	366,00
Farinha vísceras aves	195,00	195,00	195,00	195,00	195,00
Premix vitamínico-mineral ²	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Cloreto de colina	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Hidroxitolueno butilado	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
VILIGEN™	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80
Composição analisada, g kg⁻¹ na matéria seca					
Matéria seca	907,00	914,60	845,60	904,30	897,90
Proteína bruta	365,20	365,90	365,60	368,90	367,80
Proteína digestível ³	340,00	340,00	340,00	340,00	340,00
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4.600	4.658	4.621	4.574	4.630
Energia digestível ³ , kcal kg ⁻¹	3.273	3.273	3.273	3.273	3.273
Extrato etéreo	75,10	71,10	74,70	71,90	75,60
Matéria mineral	57,40	58,30	56,80	56,30	56,20
Composição analisada do VILIGEN™, g kg⁻¹ na matéria seca					
Proteína bruta	324,10				
Energia bruta, kcal kg ⁻¹	4.633				
Extrato etéreo	42,50				
Matéria mineral	191,13				
Butirato de sódio	3,50				
Zinco	11,97				

¹Milho fornecido pela Agroterra (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Farelo de soja, 48% proteína bruta, fornecido por Nicoluzzi Rações Ltda. (Penha, Santa Catarina, Brasil). Farinha de vísceras de aves, 68% proteína bruta, fornecida por Kabsa S.A. (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). VILIGEN™ produzido pela Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky, EUA). ²Cargill (Campinas, São Paulo, Brasil). Níveis de garantia por kg de produto: ácido fólico 420 mg, ácido pantotênico 8333 mg, BHT 25.000 mg, biotina 134 mg, sulfato de cobalto 27 mg, sulfato de cobre 1833 mg, sulfato ferroso 8000 mg, iodato de cálcio 92 mg, sulfato de manganês 3500 mg, niacina 8,333 mg, selenito 100 mg, vitamina (vit.) A 1,666,670 UI, vit. B₁ 2083 mg, vit. B₁₂ 5000 µg, vit. B₂ 4166 mg vit. B₆ 3166 mg, equivalente a ácido ascórbico 66,670 mg, vit. D₃ 666.670 UI, vit. E 16,666 UI, vit. K₃ 833 mg, sulfato de zinco 23,330 mg, inositol 50.000 mg, propionato de cálcio 250.000 mg. ³Estimada com base nos coeficientes de digestibilidades dos ingredientes propostos por Furuya para tilápia-do-nylo (2010).

Para confecção das rações, os ingredientes foram moídos em um moinho de martelo (1 mm) e peneirados (0,5 mm). Em seguida, pesados em balança semi-analítica, misturados e homogeneizados, conforme as respectivas formulações. Após este processo, a umidade foi ajustada até atingir 21%, para que a mistura fosse processada em uma extrusora piloto de rosca única (MX40, INBRAMAQ, Ribeirão Preto, Brasil), com uma matriz de 1,5 mm a uma de temperatura 100 °C. Após o processo de extrusão, as rações foram secas em estufa de ventilação forçada por 4 h, acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas a -20 °C.

Os ingredientes e as dietas experimentais foram analisados quanto à composição centesimal, conforme as normas da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1999). A umidade avaliada por meio da secagem em estufa a 105 °C (método 950.01), extrato etéreo por Soxhlet, (método 920.39C), proteína bruta, por Kjeldahl, fator de correção 6,25 (método 945.01) e cinzas por incineração em mufla à 550 °C (método 942.05). A energia bruta foi determinada em bomba calorimétrica (PARR, model ASSY 6200), seguindo instruções do fabricante do equipamento. A proteína digestível e energia digestível foram estimadas com base nos coeficientes de digestibilidade dos ingredientes propostos por Furuya para tilápia-do-nilo (2010).

2.2.2 Peixes e condições experimentais

Juvenis de tilápia-do-nilo da linhagem *Genetic Improvement of Farmed Tilapia* (GIFT), invertidos sexualmente para machos, foram adquiridos de uma piscicultura comercial (Piscicultura Pomerode, Pomerode, SC). O desenho experimental, manejo dos peixes e os procedimentos realizados neste estudo obtiveram aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA, UFSC), sob protocolo nº 2200250219.

Os peixes inicialmente passaram por um período de 7 dias de aclimatação às condições laboratoriais, sendo alimentados duas vezes ao dia com a dieta controle, sem a adição de VILIGEN™. Posteriormente, foram transferidos para 30 unidades experimentais, com capacidade de 200 L, as quais estavam conectadas a um sistema de recirculação, com temperatura controlada (28 °C), aeração constante, vazão de entrada de água de 40 mL s⁻¹, filtragem mecânica e biológica. O fotoperíodo foi ajustado para 12 h.

Cada unidade experimental recebeu 28 peixes, com peso inicial médio de 1,98 g ± 0,04 e comprimento médio de 4,83 cm ± 0,04. As cinco dietas experimentais, com níveis crescentes de VILIGEN™, foram distribuídas aleatoriamente às unidades experimentais, seguindo um

delineamento completamente casualizado, com seis repetições para cada nível testado. Os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (09:00 h e 16:30 h) até à saciedade aparente por um período de 60 dias. Diariamente foram monitorados e registrados o consumo alimentar e eventuais mortalidades. Ao final do período experimental, os peixes apresentaram peso final médio de $50,41 \text{ g} \pm 1,33$.

As variáveis indicadoras da qualidade da água, como temperatura ($28,33 \pm 0,28 \text{ }^\circ\text{C}$) e oxigênio dissolvido ($6,35 \pm 0,49 \text{ mg L}^{-1}$) e pH ($6,74 \pm 0,19$) foram aferidos diariamente, com o uso de uma sonda multiparâmetro digital (Hanna Instruments HI-9828). A amônia total ($0,15 \pm 0,11 \text{ mg L}^{-1}$), nitrito ($0,03 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$) e alcalinidade ($44,28 \pm 10,61 \text{ CaCO}_3 \text{ mg L}^{-1}$) foram mensurados semanalmente, por meio de fotolorímetro, segundo a metodologia de Golterman et al. (1978). Todas as variáveis de qualidade da água permaneceram dentro da zona de conforto para a tilápia-do-nilo (POPMA AND LOVSHIN, 1995).

2.2.3 Coletas de amostras

Ao final do ensaio experimental, os animais foram mantidos em jejum durante 48 h para o esvaziamento do trato intestinal. Após este período, três peixes de cada unidade experimental foram sacrificados por uma superdose de Eugenol[®] (200 mg L^{-1}), sendo feita uma incisão na região ventral. Os intestinos foram removidos, limpos de qualquer tecido adiposo mesentérico, sendo a porção medial do mesmo coletada. A porção medial do intestino de um peixe foi utilizada para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) e as duas restantes, armazenadas a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para a quantificação proteica das junções oclusivas por *western blot*.

2.2.4 Análises de microscopia eletrônica

Para a avaliação dos aspectos morfológicos e integridade intestinal, foram separadas, da região medial do intestino, duas porções transversais de aproximadamente 2 cm de comprimento de um peixe por unidade experimental, para análise de MEV e MET.

2.2.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras foram fixadas por imersão em solução de glutaraldeído a 2,5% e paraformaldeído a 2%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M - pH 7,2 por 24 h (STANDEN et

al., 2015). Após, foram lavadas individualmente com tampão cacodilato de sódio 0,1 M por três vezes. Finalizada esta etapa, os tecidos foram cortados em porções de aproximadamente 2 mm e imersos em solução de tetróxido de ósmio 1% (OsO_4), em tampão cacodilato 0,1 M por 2 h.

Na sequência, realizou-se a desidratação em série crescente de álcool de 30 a 100% (30 min por concentração). Posteriormente, as amostras foram coladas em suportes metálicos (stubbs) e os segmentos foram secos com hexametildissilazano (HMDS). Por fim, foram recobertas com camada de 200 Å de ouro (EM SCD 500, Leica, Viena, Áustria).

As fotomicrografias foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol XL30, *Tokyo, Japan*) a 11 kV. Nestas imagens, foi avaliado a integridade do epitélio intestinal e a presença e localização de bactérias.

2.2.4.2 Microscopia eletrônica de transmissão

O processamento das amostras para análise por MET seguiu os mesmos procedimentos adotados para análise por MEV até a etapa anterior à desidratação. Nas amostras analisadas pelo MET, a desidratação foi realizada com níveis crescentes de acetona de 30 a 100% (30 min cada concentração) e após as amostras foram infiltradas em resina Spurr, seguido pela inclusão e polimerização a 70 °C, por 24 h. Os blocos de resina foram seccionados em ultramicrotomo (Leica® Reicheit Ultracut S, Viena, Áustria). Secções ultrafinas (0,5 µm) de cada amostra (n = 6) foram alocadas sobre grades de cobre, contrastadas com acetato de uranila a 5% e pós-coradas com citrato de chumbo. As fotomicrografias foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL Ltd, Tóquio, Japão) a 80 kV.

As imagens foram capturadas e analisadas, sendo medidas a altura, largura, perímetro e densidade das microvilosidades na superfície dos enterócitos, com auxílio do software ImageJ 1.8 (Instituto Nacional de Saúde, EUA). Pelo menos seis imagens de cada amostra foram analisadas. Para a altura e largura dos microvilos, os valores médios foram obtidos usando todas as microvilosidades presentes nas imagens (média de 174 microvilosidades por tratamento dietético). A densidade dos microvilos foi realizada de acordo com Bai et al. (2017), por meio da contagem do número de microvilos na superfície dos enterócitos para uma região padronizada de 2 µm (36 medições por tratamento dietético). Além disso, uma análise qualitativa foi realizada, para avaliar: disposição e organização das microvilosidades, presença de restos celulares no lúmen, integridade do epitélio intestinal, presença e integridade dos complexos juncionais e junções oclusivas.

2.2.5 Análise de *Western blotting*

Fragmentos da porção medial do intestino de dois peixes por unidade experimental foram homogeneizados em tampão RIPA (50 mM Tris·HCl em pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM de EDTA, 1% Triton X100, 0,5% de deoxicolato, 0,1% de SDS e 100µM de PMSF (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), centrifugados por 10 min a 16.000 g a 4 °C, e o sobrenadante coletado e armazenado a -80 °C para posterior análise. A concentração de proteína foi avaliada usando o kit de ensaio de proteína do ácido bicinchonínico (*BCA Assay Kit*, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Após a quantificação, as amostras foram suspensas em tampão SDS (58,3 mM Tris, 60 mM SDS, 0,55 M glicerol, 142 mM β-mercaptoetanol e 30 mM azul de bromofenol) e água, e aquecidos por 5 min a 95 °C. A concentração de proteína utilizada por amostra foi de 10 µg para analisar a claudina 2.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (*TGX Stain-free Fastcast*) por 35 min a 300 V. A proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose, usando o sistema Transblot Turbo (*Bio-Rad, Hercules, Canadá*) a 25 V por 3 min. As membranas foram bloqueadas por 16 h a 4 °C em leite em pó desnatado a 5% em solução TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris e 1% de Tween 20 em pH 7,6), para bloquear sítios de ligação inespecíficos.

A proteína correspondente à claudina 2 foi detectada usando anticorpo policlonal de coelho, específico para essa proteína de junção (51-6100, *Invitrogen™, Carlsbad, EUA*), na concentração de 0,75 µg mL⁻¹. O anticorpo primário para claudina 2 foi diluído em TBS-T com 5% de leite e incubado nas membranas por 1 h 30 min em temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas cinco vezes (5 min) com TBS-T sob agitação contínua. Posteriormente, foi adicionado o anticorpo secundário (cabra anti-coelho conjugado com peroxidase, *Cytiva™, Amersham, United Kingdom*), em uma diluição 1:5.000 em 5% de leite com TBS-T, em todas as membranas e incubado por 1 h 30 min. Por fim, as membranas foram novamente lavadas por cinco vezes (5 min) com TBS-T sob agitação.

As bandas da proteína foram visualizadas usando um sistema de fotodocumentação *Chemidoc MP (Bio-rad, Hercules, Canadá)*. Após examinar a expressão da claudina 2, as membranas foram normalizadas pela carga total de proteínas na *lane*, usando tecnologia *stain free (Bio-rad, Hercules, Canadá)*. A expressão dessa proteína formadora de junções oclusivas e a carga de proteínas foram quantificadas usando o *software ImageLab (Bio-rad, Hercules, Canadá)*.

2.2.6 Análises estatísticas

Os dados relacionados à morfologia intestinal, quantificação proteica das junções oclusivas foram submetidos à análise de regressão polinomial para determinação do melhor nível de inclusão de VILIGEN™ nas dietas, em função das variáveis avaliadas. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados com auxílio do *software* STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Morfologia e integridade da mucosa intestinal

A morfometria macroestrutural da porção média do intestino de juvenis de tilápia-do-nilo foi notavelmente diferente entre os tratamentos (Figura 11). Peixes que receberam as suplementações de 1,20 e 2,40 g kg⁻¹ de VILIGEN™, apresentaram a camada serosa e o músculo longitudinal bem formados e de fácil identificação no corte transversal. Estes peixes também apresentaram melhor integridade macroestrutural do tecido intestinal, sem a presença de deformidades e lesões nas pregas intestinais, indicando que essa dose preveniu ou reparou possíveis danos intestinais (Figura 11). As pregas intestinais se mostraram mais desenvolvidas e com menor fusão nos peixes suplementados com 2,40 g kg⁻¹ em comparação aos outros grupos (Figura 11). Os peixes que não receberam suplementação e os que receberam suplementação de 4,80 g kg⁻¹ de VILIGEN™ apresentaram maior deformidade e fusões das pregas, respectivamente, quando comparado aos peixes que receberam os demais tratamentos. Não foi possível observar a presença de bactérias em nenhum dos tratamentos.

Por meio das eletromicrografias de transmissão foi possível observar diferença significativa na altura das microvilosidades. Essa variável apresentou uma resposta quadrática ao aumento dos níveis dietéticos de VILIGEN™ (Figura 12), sugerindo que existe um efeito dose-resposta entre a suplementação dietética do aditivo e a morfologia das microvilosidades. A maior altura das microvilosidades foi estimado em 2,50 g kg⁻¹ de inclusão de VILIGEN™ na dieta (Figura 12). Em contrapartida, a largura e a densidade das microvilosidades não foram afetadas pelos níveis crescentes de suplementação do aditivo alimentar (Tabela 5).

Figura 11. Eletromicrografia de varredura do epitélio intestinal medial de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias. L: Lúmen, S: serosa, P: prega intestinal, ML: músculo longitudinal.

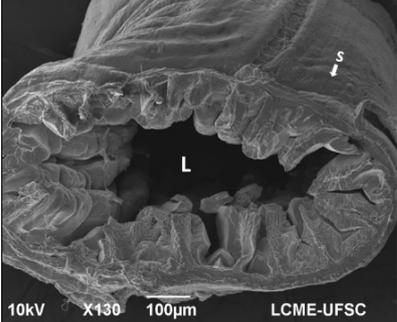
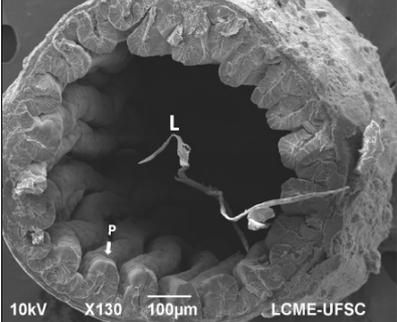
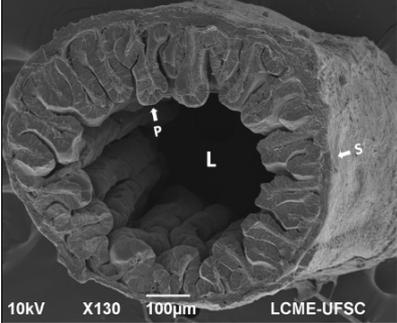
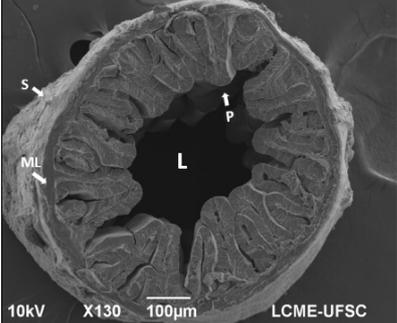
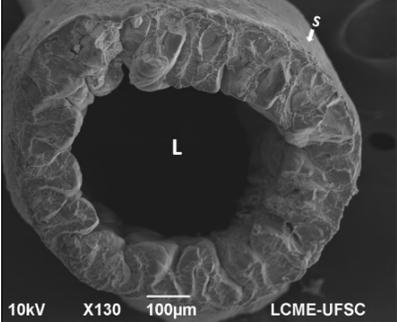
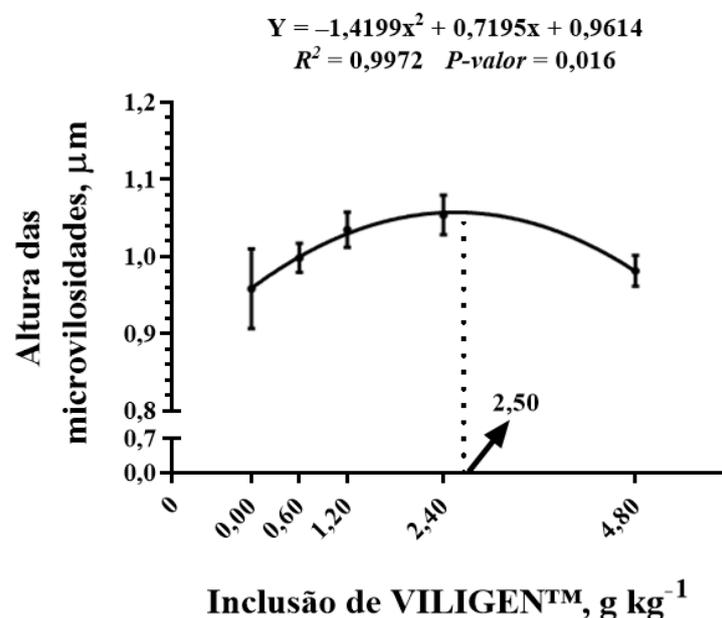
Inclusão de VILIGEN™, g kg ⁻¹	Avaliação qualitativa	Região medial do intestino
Não suplementado	Apresentou maior deformidade das pregas e lesões no tecido quando comparado aos níveis 0,60; 1,20 e 2,40 g de VILIGEN™ kg ⁻¹ de dieta.	
Suplementação de 0,60 g kg⁻¹	Ausência de pregas com deformidade e lesões no tecido. Porém, pregas intestinais menos desenvolvidas quando comparado às inclusões de 1,20 e 2,40 g kg ⁻¹ de VILIGEN™.	
Suplementação de 1,20 g kg⁻¹	Desenvolvimento intermediário das pregas intestinais, com uma leve redução na altura e deformidade na parte inferior do corte. Ausência de fusão das pregas e lesões no tecido.	
Suplementação de 2,40 g kg⁻¹	Boa integridade e morfologia intestinal. Grupo com maior desenvolvimento das pregas intestinais, ausência de fusão dessas estruturas e lesões no tecido em comparação aos outros tratamentos.	
Suplementação de 4,80 g kg⁻¹	Grupo com maior fusão das pregas intestinais e deformidade no tecido intestinal quando comparado com os grupos suplementados com VILIGEN™.	

Tabela 5. Morfometria das microvilosidades do intestino medial em juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGENTM por 60 dias (n = 6). Valores médios de seis repetições.

Variáveis	Inclusão de VILIGEN TM , g kg ⁻¹					Pooled SEM	Valor de P - regressão
	0,00	0,60	1,20	2,40	4,80		
Largura, μm	0,10	0,10	0,11	0,11	0,11	0,01	0,65
Densidade ¹	18,66	18,76	18,25	18,83	18,23	2,39	0,84

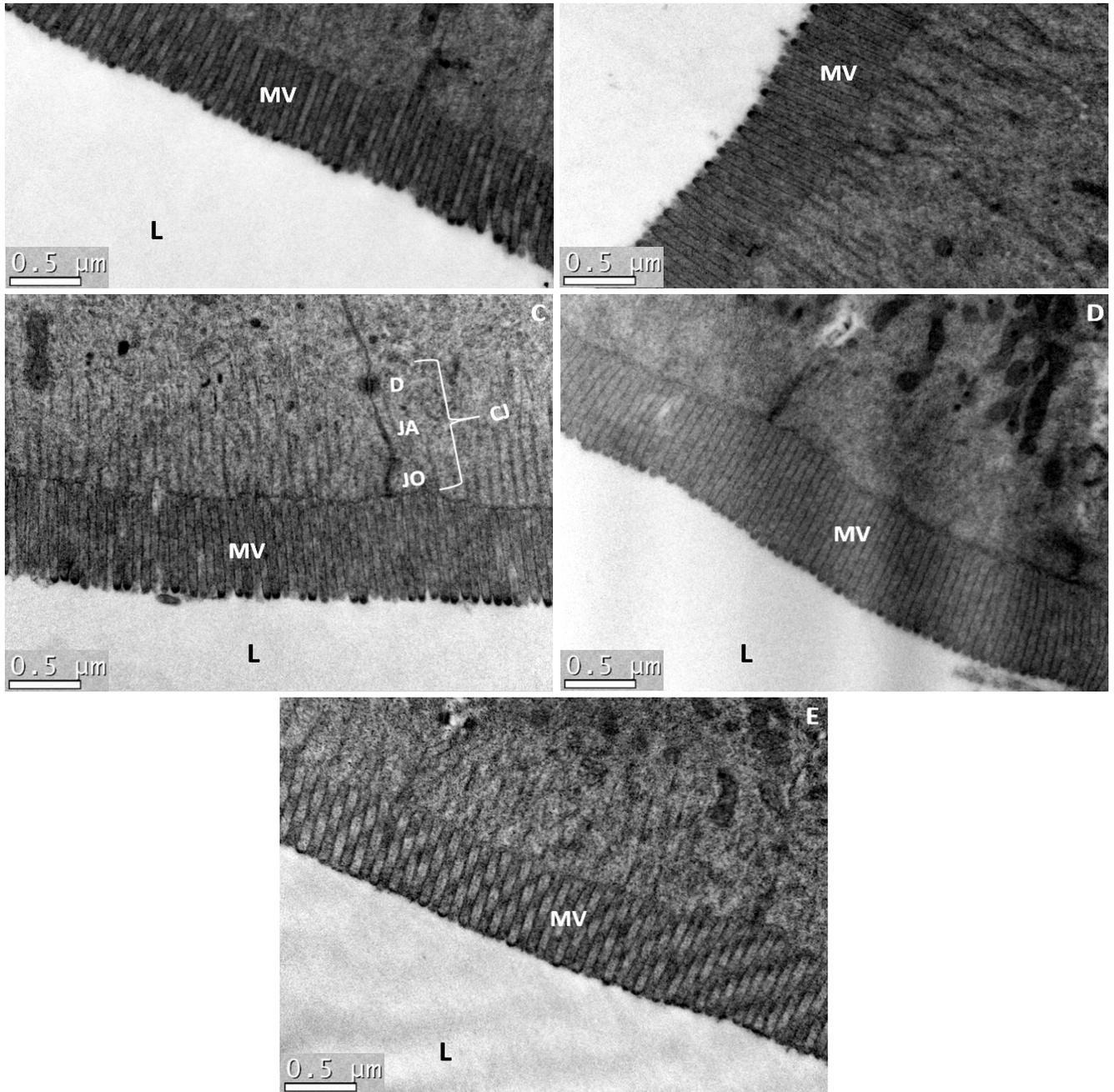
¹Densidade expressa como o número de microvilosidades em uma região de 2 μm na superfície do enterócito.

Figura 12. Altura das microvilosidades do intestino medial de juvenis de tilápia-do-nilo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGENTM por 60 dias (n=6). A linha tracejada representa o valor estimado pela equação polinomial.



Por outro lado, a MET confirmou que, independentemente do tratamento dietético, a borda em escova dos intestinos de juvenis de tilápia-do-nilo apresentou uma barreira epitelial conservada, com boa integridade, organização e adensamento das microvilosidades (Figura 13). Da mesma forma, as junções oclusivas e os complexos juncionais encontrados estavam íntegros e sem rupturas visíveis (Figura 13). Além disso, independente da presença ou não do aditivo alimentar, o epitélio intestinal microestrutural de todos os peixes estavam intactos, sem a presença de lesões e inflamação, com enterócitos bem definidos, ausência de vacúolos, translocações de microrganismos ou restos celulares no lúmen. Assim, confirma-se que a suplementação com os diferentes níveis de VILIGENTM não causou danos à integridade e a saúde do trato intestinal.

Figura 13. Eletromicrografia de transmissão do epitélio intestinal medial de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com dietas contendo níveis crescentes de VILIGENT™ por 60 dias. A) Não suplementado, B) Suplementação de 0,60 g kg⁻¹, C) Suplementação de 1,20 g kg⁻¹, D) Suplementação de 2,40 g kg⁻¹, E) Suplementação de 4,80 g kg⁻¹. L: Lúmen, MV: microvilosidades, JO: junção oclusiva, JA: junção aderente, D: desmossomo, CJ: complexo juncional.

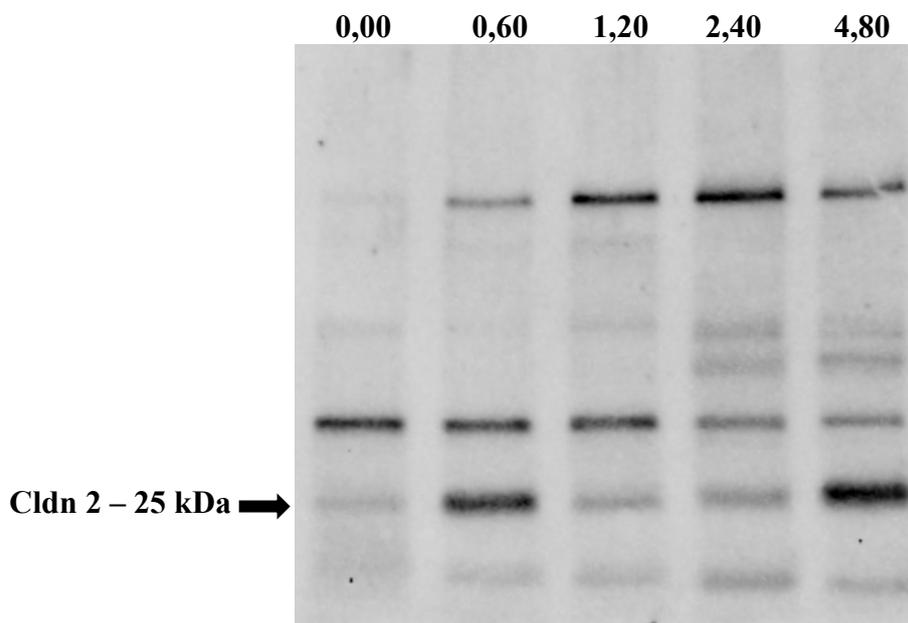


2.3.2 Proteína da junção oclusiva claudina 2

A análise de *western blot* da proteína isolada de homogenatos do intestino medial de juvenis de tilápia-do-nylo revelou bandas imunorreativas de claudina-2 (Figura 14). No entanto, os valores quantificados dessa junção oclusiva não diferiram estatisticamente entre os

tratamentos, apresentando valores de 0,18; 0,23; 0,20; 0,16 e 0,22 unidades arbitrárias para inclusão de 0,00; 0,60; 2,40 e 4,80 g kg⁻¹ de VILIGEN™ na dieta, respectivamente. Demonstrando que a inclusão do aditivo alimentar não alterou a homeostase da barreira física intestinal.

Figura 14. Quantificação relativa da proteína da junção oclusiva claudina 2 no intestino medial de juvenis de tilápia-do-nylo alimentados com níveis crescentes de VILIGEN™ por 60 dias. A intensidade das bandas foi quantificada pelo *software ImageLab*.



2.4 DISCUSSÃO

Diferente de outros trabalhos que avaliaram o impacto individual do butirato de sódio, da levedura hidrolisada ou do proteinato de zinco na nutrição de peixes (ABDEL-MOHSEN et al., 2018; CHEN et al., 2019; DAWOOD et al., 2020a; LUZ et al., 2019; TAN et al., 2011; TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA et al., 2020), aqui foi explorado o efeito combinado destes compostos, através da utilização do aditivo alimentar VILIGEN™, sobre a morfologia, integridade e barreira física intestinal de juvenis de tilápia-do-nylo. A presente investigação demonstrou que a inclusão de VILIGEN™ na dieta resultou em maior altura das microvilosidades em comparação aos peixes alimentados sem o aditivo. A maior altura estimada das microvilosidades apresentou um acréscimo de 9,38% quando comparado ao grupo não suplementado. Como a absorção de nutrientes está relacionada ao comprimento das microvilosidades (AKTER et al., 2016; CRAWLEY et al., 2014), a suplementação do

VILIGEN™ aumentou claramente a área de superfície de absorção do intestino das tilápias-do-nylo. Similarmente, o maior desenvolvimento das pregas intestinais também foi registrada nos peixes suplementados com 2,40 g de VILIGEN™ kg⁻¹ de dieta.

Os resultados encontrados provavelmente estão relacionados à capacidade do butirato de beneficiar o epitélio da mucosa intestinal (BEDFORD; GONG, 2018; TRAN et al., 2020). Por ser uma importante fonte de energia metabólica para as células intestinais, é prontamente absorvido por difusão não iônica através da membrana apical do enterócito, produzindo ATP via β -oxidação mitocondrial (BOURASSA et al., 2016). Assim, diminui a oxidação da glicose e aumenta o armazenamento de glicogênio hepático, que servirá de reserva de glicose para as células (BEAUVIEUX et al., 2008). O butirato é uma molécula multifuncional com potencial terapêutico, pois mantém o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose celular já que é modulador gênico de algumas etapas dos processos do ciclo celular (BLOTTIÈRE et al., 2003). Além disso, promove a liberação de peptídeos gastrointestinais e/ou fatores de crescimento (BLOTTIÈRE et al., 2003), contribuindo com o desenvolvimento dos enterócitos e da morfologia intestinal, conservando a integridade e saúde do epitélio intestinal (CLAUS; GÜNTNER; LETZGUSS, 2007; TRAN et al., 2020). Estudos realizados recentemente com a tilápia-do-nylo (DAWOOD et al., 2020a; JESUS et al., 2019), pirarucu (*Arapaima gigas*) (LUZ et al., 2019), carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) (ZHOU et al., 2019) e robalo europeu (*Dicentrarchus labrax*) (ABDEL-MOHSEN et al., 2018) também demonstraram que a suplementação de butirato de sódio resultou no aumento da altura das pregas intestinais dos peixes. Embora o butirato seja visto como estimulador do trato gastrointestinal, melhorando a micro e macroestrutura intestinal, o seu efeito sobre a morfologia em nível microestrutural (influência sobre as microvilosidades) não havia sido descrito até o presente momento em peixes. No entanto, já é confirmado que a sua suplementação em outros vertebrados, estimula o correto desenvolvimento do trato gastrointestinal, melhorando a morfologia e a proliferação celular (GÓRKA et al., 2009; KOTUNIA et al., 2004; LIU et al., 2016; WU et al., 2018; ZOU et al., 2019). Diante desses atributos, o aumento na altura das pregas e das microvilosidades intestinais podem estar relacionadas com os efeitos positivos do butirato na tilápia-do-nylo.

Além dos benefícios do butirato de sódio, três dos principais componentes da levedura hidrolisada – nucleotídeos, β G e MOS – quando suplementados individualmente, também proporcionam benefícios à morfologia intestinal dos peixes (AKTER et al., 2016; BURRELLS et al., 2001; CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011; DIMITROGLOU et al., 2009, 2010, 2011; HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019; REN et al., 2020; SALEM et al., 2016; TORRECILLAS et al., 2013, 2011b). Os nucleotídeos têm múltiplos efeitos benéficos

no trato gastrointestinal dos vertebrados, atuando sobre a fisiologia, microbiota e morfologia intestinal (CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011). Apesar da contínua investigação da utilização de nucleotídeos na nutrição de peixes, poucos estudos relatam os seus efeitos na morfologia intestinal. Somente Burrells et al. (2001) e Cheng, Buentello, Gatlin (2011), descreveram que a suplementação de nucleotídeos também aumentou a altura das pregas intestinais do salmão do atlântico (*Salmo salar L.*) e do red drum (*Sciaenops ocellatus*), respectivamente. Além disso, no red drum (CHENG; BUENTELLO; GATLIN, 2011) e no robalo europeu (BOWYER et al., 2019) a altura das microvilosidades foram significativamente maiores mediante a administração de nucleotídeos. Em outros vertebrados, como frangos e suínos, os efeitos dos nucleotídeos na morfologia intestinal foram melhor estudados, mostrando que este nutriente resulta no aumento das características morfométricas das pregas em vários segmentos do intestino (DANESHMAND et al., 2017a, 2017b; DOMENEGHINI et al., 2004; GAO et al., 2020; JUNG; BATAL, 2012; MOORE et al., 2011; VALINI et al., 2020). A melhora na morfologia intestinal aqui relatada, pode estar associada ao aumento no conteúdo de nucleotídeo, os quais que possuem efeitos modulatórios na divisão celular, maturação e reparo da mucosa intestinal (LI; GATLIN, 2006; ORTEGA; GIL; SÁNCHEZ-POZO, 1995; SAUER et al., 2012).

Igualmente aos nucleotídeos, poucos estudos descrevem as implicações das β G na morfologia intestinal de peixes. No entanto, na carpa espelho (*Cyprinus carpio L.*) a administração dietética de β G (MacroGard[®]) por quatro semanas também aumentou significativamente o comprimento das microvilosidades, em comparação aos peixes suplementados com a menor dose e o grupo controle (KÜHLWEIN et al., 2013). Em tilapia-do-nilo criada em diferentes densidades de estocagem, a inclusão de β G mitigou os impactos negativos da densidade mais alta e aumentou a altura das pregas intestinais (DAWOOD et al., 2020b). Esses resultados estão de acordo com os encontrados em frangos de corte, onde a administração das β G de levedura na dieta resultou em aumento da altura das vilosidades, na densidade das células caliciformes e na razão entre a altura das vilosidades e a profundidade da cripta, após o desafio com *Salmonella typhimurium* (SHAO; GUO; WANG, 2011). Similarmente, frangos de corte quando infectados com *Clostridium perfringens*, a suplementação também aumentou a altura das vilosidades quando comparado ao grupo não suplementado. Sendo assim, o aumento desses parâmetros demonstram a capacidade das β G de manter um epitélio maduro e funcionalmente ativo, mesmo em situação de desafio (TIAN et al., 2016).

Diferentemente dos nucleotídeos e das β G, os MOS são prebióticos amplamente utilizados em rações aquícolas, apresentando mais estudos avaliando seus efeitos na morfologia intestinal de diversas espécies de peixes. Foi relatado o aumento na altura das pregas intestinais da tilápia-do-nilo (HA et al., 2017), garoupa híbrida (*Epinephelus lanceolatus* \times *Epinephelus fuscoguttatus*) (REN et al., 2020), panga (*Pangasianodon hypophthalmus*) (AKTER et al., 2016), panga híbrido (*P. gigas* \times *P. hypophthalmus*) (HAHOR; THONGPRAJUKAEW; SUANYUK, 2019) e do robalo europeu (TORRECILLAS et al., 2011). Da mesma forma, quando avaliada a microestrutura intestinal, por meio de MET, também foi constatado o aumento da altura das microvilosidades da dourada (*Sparus aurata*) (DIMITROGLOU et al., 2010), panga (AKTER et al., 2016), red drum (ZHOU; BUENTELLO; GATLIN, 2010), robalo europeu (SALEM et al., 2016; TORRECILLAS et al., 2013), salmão do Atlântico (DIMITROGLOU et al., 2011) e da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (DIMITROGLOU et al., 2009). Os benefícios dos MOS podem ser atribuídos à modulação seletiva da microbiota intestinal, através da sua capacidade de aglutinar bactérias patogênicas (GÜLTEPE et al., 2011), reduzindo assim a formação de colônias nocivas que competem por nutrientes (TORRECILLAS; MONTERO; IZQUIERDO, 2014). Como consequência, há maior disponibilidade de nutrientes para o desenvolvimento morfológico da mucosa intestinal (AZEVEDO et al., 2016; DIMITROGLOU et al., 2009; PELICANO et al., 2005).

O aditivo testado também contém zinco, na forma de proteínato de zinco, que, por estar quelado a uma proteína, é mais biodisponível em comparação às formas inorgânicas (PARIPATANANONT; LOVELL, 1995), sendo melhor absorvido pelas células epiteliais. Embora mais biodisponível, a utilização da forma orgânica na nutrição animal pode ser limitada devido ao elevado custo (ZHAO; TAN; XIAO, 2014). Alguns estudos mostraram que a suplementação de zinco orgânico em juvenis da carpa Jian aumentaram a altura das pregas intestinais (TAN et al., 2011). Já na carpa capim, a suplementação dietética com níveis baixos aumentou a apoptose celular no intestino (SONG et al., 2017) o que, consequentemente, afeta negativamente os parâmetros morfológicos intestinais. Esses achados condizem com os resultados obtidos no presente estudo, onde a suplementação de zinco orgânico, por meio do VILIGEN™, também beneficiou a morfologia intestinal da tilápia-do-nilo. Estas melhoras estão associadas ao importante papel do zinco, que é um componente de mais de 300 enzimas (VALLEE; FALCHUK, 1993), sendo essencial na regulação da síntese de DNA, RNA e proteínas, além de atuar em processos celulares de proliferação, renovação, reparo (HU et al., 2013; TRUONG-TRAN et al., 2001) e controle da apoptose das células epiteliais

(BEYERSMANN; HAASE, 2001). O zinco afeta a secreção do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) (MACDONALD, 2000), sendo o mensageiro da sinalização mitogênica (GRUMMT et al., 1986) e interferindo na atividade das caspases e das endonucleases, inibindo a apoptose (TRUONG-TRAN et al., 2001).

No que tange à integridade intestinal macroestrutural, observada nas micrografias de varredura, foi observado melhora na histomorfologia e integridade das pregas intestinais, que também estão associadas à maior área de superfície de absorção e, portanto, melhor digestão e absorção de nutrientes (ABDEL-MOHSEN et al., 2018; CERZUELA et al., 2012), resultando em melhor desempenho. Além do mais, um epitélio íntegro e saudável reduz as chances de infecções bacterianas (DIMITROGLOU et al., 2009; SIDDIK; HOWIESON; FOTEDAR, 2019), evitando que os nutrientes sejam desviados do crescimento e destinados para ativação do sistema imunológico e reparos intestinais (MCKAY et al., 2010). Porém, nas micrografias feitas *via* MET, o presente estudo constatou que não houve influência da suplementação de VILIGEN™ na microestrutura intestinal. Os intestinos de todos os peixes, independente do tratamento, apresentaram epitélios íntegros, com complexos juncionais íntegros e sem características relacionadas a danos na saúde intestinal, tais como presença de lesões e inflamação, translocações de microrganismos e restos celulares no lúmen. A ausência de danos à saúde intestinal em todos os tratamentos podem estar associada à densidade das microvilosidades, pois a correta densidade pode reduzir a exposição dos complexos juncionais entre os enterócitos, fornecendo assim uma barreira física eficaz contra potenciais patógenos (STANDEN et al., 2015). Além do mais, a adequada integridade pode também explicar a ausência de translocação bacteriana no presente estudo, pois a translocação ocorre quando existem danos nos enterócitos ou afrouxamento das junções celulares (RINGØ et al., 2007), características estas não observadas no estudo. Provavelmente a ausência de influência do aditivo alimentar na integridade intestinal, observado *via* MET, pode estar relacionada às condições adequadas de criação do presente estudo, sem exposição a estressores ambientais e/ou dietéticos, o que promoveu a homeostase do intestino. Os resultados aqui encontrados sugerem que a correta morfologia e integridade intestinal influenciam o crescimento dos peixes, já que tilápias-do-nilo suplementadas com as mesmas doses de VILIGEN™, apresentaram maior ganho de peso diário em comparação àquelas alimentadas sem o aditivo (PESSINI et al., 2021). Portanto, os resultados obtidos nas imagens de microscopia eletrônica indicam que a inclusão desse aditivo alimentar induz melhorias morfológicas e de integridade intestinal macroestrutural que se refletem no crescimento.

Além da integridade do epitélio intestinal, a integridade intercelular é um fator importante para manutenção da barreira física intestinal dos peixes (NIKLASSON, 2013). Essa integridade está associada principalmente às junções oclusivas, compostas por proteínas transmembranares adesivas (claudinas, ocludinas e moléculas de adesão juncional) (VAN ITALLIE; ANDERSON, 2006) e proteínas citoplasmáticas (*zonula occludens*) (ANDERSON; VAN ITALLIE, 2009; WELLS et al., 2017), que cruzam a bicamada lipídica, ligando as células adjacentes e regulando a passagem de moléculas pela via paracelular (RODRIGUES et al., 2016). A claudina-2 é formadora de canais paracelulares seletivos para cátions e permeáveis à água (KRUG; SCHULZKE; FROMM, 2014), sendo predominantemente presente em epitélios de vazamento (LUETTIG et al., 2015) e possuindo um papel importante na patogênese de doenças inflamatórias intestinais (GARCIA-HERNANDEZ; QUIROS; NUSRAT, 2017). A superexpressão dos níveis de mRNA ou da proteína dessa junção estão relacionados ao aumento da permeabilidade intestinal, que promove maior internalização de moléculas e organismos nocivos, causadores de inflamação intestinal (ZHANG et al., 2013). Nosso estudo revelou que os níveis da proteína claudina-2 não foram influenciados pela suplementação de VILIGENT™ na dieta. Com isso, concluímos que os níveis suplementados do aditivo não foram capazes de afetar a barreira física e a integridade microestrutural do intestino, corroborando com os resultados obtidos nas imagens de MET. Além do mais, os mesmos condizem com a hipótese que a ausência de influência do aditivo na integridade intestinal microestrutural pode estar relacionada às boas condições de criação dos peixes. Reforçando essa hipótese, Zhang et al. (2013) descreveram que células epiteliais humanas submetidas à infecção por *Salmonella typhimurium*, apresentaram um acréscimo significativo nos níveis da proteína claudina 2 no intestino, resultando no aumento da permeabilidade celular e maior translocação bacteriana. Em contraste, deficiência da proteína claudina-2 em ratos causou má absorção de nutrientes, levando-os a morte por desnutrição (WADA et al., 2013). Isto é explicado pelo fato da claudina-2 ser primordial para a homeostase da absorção de nutrientes Na⁺-dependente, tais como glicose, aminoácidos, lipídios e micronutrientes (RODRIGUES et al., 2016; WADA et al., 2013). Diante disso, nossos resultados demonstraram que a suplementação de VILIGENT™ proporcionou níveis equilibrados de claudina-2, capazes de manter o equilíbrio entre a absorção de nutrientes e a manutenção da saúde microestrutural do epitélio intestinal. No entanto, pesquisas adicionais serão necessárias para fornecer mais informações dos efeitos do VILIGENT™ sobre outras estruturas importantes da barreira física intestinal.

2.5 CONCLUSÃO

O aditivo alimentar Viligen™ beneficia a morfologia e a integridade intestinal de juvenis de tilápia-do-nilo, mas não altera a barreira física intestinal, quando utilizado na dose de 2,50 g/kg.

AGRADECIMENTOS

Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil, Código Financeiro 001), que concedeu bolsas para o primeiro, segundo e terceiro autor. Os autores também agradecem ao CNPq-Brasil pela bolsa concedida ao quinto e o último autor. Agradecemos às empresas Alltech Inc. (Nicholasville, KY, EUA) pelo apoio financeiro neste estudo e à Cargill (Toledo, Brasil), Nicoluzzi Rações Ltda (Penha, Brasil) e Kabsa Exportadora SA (Porto Alegre, Brasil) pela doação ingredientes para a fabricação das dietas experimentais. Agradecemos também ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) e Laboratório de Biomarcadores de Contaminação Aquática e Imunoquímica (LABCAI), ambos vinculados à UFSC, pelo apoio nas análises de microscopia eletrônica e de *western blot*, respectivamente.

2.6 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MOHSEN, H. H. et al. Advantageous effects of dietary butyrate on growth, immunity response, intestinal microbiota and histomorphology of european seabass (*Dicentrarchus labrax*) fry. **Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries**, v. 22, n. 4, p. 93–110, 2018.
- ADEOYE, A. A. et al. Combined effects of exogenous enzymes and probiotic on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth, intestinal morphology and microbiome. **Aquaculture**, v. 463, p. 61-70, out. 2016.
- AKTER, M. N. et al. 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, 28 fev. 2016.
- ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Effect of feed contaminants on intestinal health of monogastric farm animals. In: NIEWOLD, T. (Ed.). **Intestinal health - Key to maximise growth performance in livestock**. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2015. p. 169–190.

- ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002584, 1 ago. 2009.
- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, 1999.
- ASSIMAKOPOULOS, S. F. et al. The Role of the Gut Barrier Function in Health and Disease. **Gastroenterology Research**, v. 11, n. 4, p. 261–263, 2018.
- AZEVEDO, R. V. et al. Dietary mannan oligosaccharide and *Bacillus subtilis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 347–353, 2016.
- BAI, N. et al. Protective effects of mannan oligosaccharides on turbot *Scophthalmus maximus* suffering from soy enteropathy. **Aquaculture**, v. 476, n. February, p. 141–151, 2017.
- BEAUVIEUX, M. C. et al. Butyrate ingestion improves hepatic glycogen storage in the re-fed rat. **BMC Physiology**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2008.
- BEDFORD, A.; GONG, J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 151–159, 2018.
- BEYERSMANN, D.; HAASE, H. Functions of zinc in signaling , proliferation and differentiation of mammalian cells. **BioMetals**, v. 14, p. 331–341, 2001.
- BLOTTIÈRE, H. M. et al. Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation. **Proceedings of The Nutrition Society**, v. 62, p. 101–106, 2003.
- BOURASSA, M. W. et al. Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? **Neuroscience Letters**, v. 625, p. 56–63, 2016.
- BOWYER, P. H. et al. Dietary nucleotides enhance growth performance, feed efficiency and intestinal functional topography in European Seabass (*Dicentrarchus labrax*). **Aquaculture Research**, v. 50, n. 7, p. 1921–1930, 2019.
- BURRELLS, C. et al. Dietary nucleotides: A novel supplement in fish feeds: 2. Effects on vaccination, salt water transfer, growth rates and physiology of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Aquaculture**, v. 199, n. 1–2, p. 171–184, 2001.
- CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, n. Sep., p. 88–100, dez. 2017.
- CELI, P. et al. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, n. February, p. 9–31, 2019.
- CEREZUELA, R. et al. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. **Cell and Tissue Research**, v. 350, p. 477–489, 2012.

- CHEN, X. Q. et al. Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 90, n. Apr., p. 30–39, 2019.
- CHENG, Z.; BUENTELLO, A.; GATLIN, D. M. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 143–147, 2011.
- CLAUS, R.; GÜNTNER, D.; LETZGUSS, H. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 7–8, p. 312–318, 2007.
- CRAWLEY, S. W. et al. Intestinal Brush Border Assembly Driven by Protocadherin-Based Intermicrovillar Adhesion. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 433–446, 2014.
- DANESHMAND, A. et al. Combination of purine and pyrimidine nucleosides influences growth performance, gut morphology, digestive enzymes, serum biochemical indices and immune functions in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, n. March, p. 186–193, 2017a.
- DANESHMAND, A. et al. Effects of pyrimidine nucleosides on growth performance, gut morphology, digestive enzymes, serum biochemical indices and immune response in broiler chickens. **Livestock Science**, v. 204, n. August, p. 1–6, 2017b.
- DAWOOD, M. A. O. et al. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 88, n. Nov., p. 102500, 2020a.
- DAWOOD, M. A. O. et al. The role of β -glucan in the growth, intestinal morphometry, and immune-related gene and heat shock protein expressions of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) under different stocking densities. **Aquaculture**, v. 523, n. March, p. 735205, 2020b.
- DIMITROGLOU, A. et al. 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.
- DIMITROGLOU, A. et al. 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, p. 182–188, 2010.
- DIMITROGLOU, A. et al. The Effect of Mannan Oligosaccharide Supplementation on Atlantic Salmon Smolts (*Salmo salar* L.) Fed Diets with High Levels of Plant Proteins. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 1, 2011.
- DOMENEGHINI, C. et al. Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. **Histology and Histopathology**, v. 19, p. 49–58, 2004.

EL-SAYED, A.-F. M. Current state and future potential. In: EL-SAYED, A.-F. M. (Ed.). **Tilapia Culture**. 2. ed. Elsevier, 2020. p. 1–20.

FURUYA, W. M. **Tabelas brasileiras para a nutrição de tilápias**. Toledo: GFM, 2010. 100 p.

GAO, L. et al. Yeast-based nucleotide supplementation in mother sows modifies the intestinal barrier function and immune response of neonatal pigs. **Animal Nutrition Journal**, v. 7, n. 4, p. 1–30, 2020.

GARCIA-HERNANDEZ, V.; QUIROS, M.; NUSRAT, A. Intestinal epithelial claudins : expression and regulation in homeostasis and inflammation. **Annals of the new york academy of sciences**, v. 1397, p. 66–79, 2017.

GOLTERMAN, H.; CLYMO, R.S.; OHNSTAD, M.A.M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh water**. Black well Scientific Publications Ltd. Oxford, p. 213, 1978.

GOOSSENS, T. Improving Gut Health Of Production Animals; Looking For Ways To Optimise Functional Feed Additives. **International Animal Health Journal**, v. 2, n. 4, p. 76–82, 2015.

GÓRKA, P. et al. Effect of sodium butyrate supplementation in milk replacer and starter diet on rumen development in calves. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 60, n. June 2014, p. 47–53, 2009.

GRUMMT, F. et al. Zinc as a second messenger of mitogenic induction: Effects on diadenosine tetraphosphate (Ap4A) and DNA synthesis. **Experimental Cell Research**, v. 163, p. 191–200, 1986.

GÜLTEPE, N. et al. Dietary supplementation with Mannan oligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 482–487, 2011.

HA, N. et al. Dietary carbohydrates and protein of yeast modulate the early stages of innate immune response in tilapia (*Oreochromis niloticus*) primarily after LPS inoculation. **Aquaculture International**, v. 25, p. 755–776, 2017.

HAHOR, W.; THONGPRAJUKAEW, K.; SUANYUK, N. Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquaculture**, v. 507, n. Dec., p. 97–107, 2019.

HU, C. et al. Diosmectite-zinc oxide composite improves intestinal barrier function , modulates expression of pro-inflammatory cytokines and tight junction protein in early weaned pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 681–688, 2013.

JESUS, G. F. A. et al. Use of protected forms of sodium butyrate benefit the development and intestinal health of Nile tilapia during the sexual reversion period. **Aquaculture**, v. 504, n. February, p. 326–333, 2019.

JUNG, B.; BATAL, A. B. Effect of dietary nucleotide supplementation on performance and development of the gastrointestinal tract of broilers. **British Poultry Science**, v. 53, n. February 2014, p. 98–105, 2012.

JUTFELT, F. **The Intestinal Epithelium of Salmonids - Transepithelial Transport, Barrier Function and Bacterial Interactions**. Göteborg University, 2006.

KOTUNIA, A. et al. Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets fed by artificial sow. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 2, p. 59–68, 2004.

KRUG, S. M.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 166–176, 2014.

KÜHLWEIN, H. et al. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 1091–1106, 2013.

KUMAR, N. et al. Dietary zinc promotes immuno-biochemical plasticity and protects fish against multiple stresses. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 62, p. 184-194, mar. 2017.

LI, P.; GATLIN, D. M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, n. 2–4, p. 141–152, 2006.

LI, S. et al. Dietary myo-inositol deficiency decreased the growth performances and impaired intestinal physical barrier function partly relating to nrf2, jnk, e2f4 and mlck signaling in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 67, p. 475-492, ago. 2017.

LIU, J. D. et al. Evaluation of encapsulated sodium butyrate on growth performance, energy digestibility, gut development, and Salmonella colonization in broilers. **Poultry Science**, v. 96, n. 10, p. 3638–3644, 2016.

LUETTIG, J. et al. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1, 2015.

LUZ, J. R. et al. Use of sodium butyrate in the feeding of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) juvenile. **Aquaculture**, v. 510, n. May, p. 248–255, 2019.

MACDONALD, R. S. The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1500S-1508S, 1 maio 2000.

MAZZONI, M. et al. Supplemental sodium butyrate stimulates different gastric cells in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 8, p. 1426–1431, 2008.

MCKAY, S. et al. Environmental enteropathy: New targets for nutritional interventions. **International Health**, v. 2, n. 3, p. 172–180, 2010.

MOORE, K. L. et al. The use of nucleotides, vitamins and functional amino acids to enhance the structure of the small intestine and circulating measures of immune function in the post-weaned piglet. **Animal Feed Science and Technology**, v. 165, n. 3–4, p. 184–190, 2011.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C.: National Academy Press, 2011.

NIKLASSON, L. **Intestinal Mucosal Immunology of Salmonids. Response to Stress and Infection and Crosstalk with the Physical Barrier**. 2013. Thesis (Department of Biological and Environmental Sciences) University of Gothenburg. Sweden, 2013.

ORTEGA, M. A.; GIL, A.; SÁNCHEZ-POZO, A. Maturation status of small intestine epithelium in rats deprived of dietary nucleotides. **Life Sciences**, v. 56, n. 19, p. 1623–1630, 1995.

PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. T. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 133, n. 1, p. 73–82, 1995.

PELICANO, E. et al. Carcass and cut yields and meat qualitative traits of broilers fed diets containing probiotics and prebiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 3, p. 169–175, 2005.

PESSINI, J. E. et al. Dietary supplementation of Viligen™ to Nile tilapia improves growth and gut morphology. **Aquaculture Nutrition**, n. July 2020, p. anu.13247, 30 mar. 2021.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. L. **Worldwide prospects of commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1995.

REN, Z. et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and immune-related gene expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ × *Epinephelus fuscoguttatus* ♀). **Aquaculture**, v. 523, n. Mar., p. 735195, 2020.

RINGØ, E. et al. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. **Aquaculture**, v. 268, n. 1–4, p. 251–264, 2007.

RODRIGUES, F. A. DE P. et al. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. D. C. (Eds.). **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 441–440.

SALEM, M. et al. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition and intestine of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Aquaculture Research**, v. 47, p. 3516–3525, 2016.

SAUER, N. et al. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 9, p. 3126–3134, 2012.

SHAO, Y.; GUO, Y.; WANG, Z. β -1,3/1,6-Glucan alleviated intestinal mucosal barrier impairment of broiler chickens challenged with *Salmonella* enterica serovar Typhimurium. **Poultry Science**, v. 92, n. 7, p. 1764–1773, 2011.

SIDDIK, M. A. B.; HOWIESON, J.; FOTEDAR, R. Beneficial effects of tuna hydrolysate in

poultry by-product meal diets on growth, immune response, intestinal health and disease resistance to *Vibrio harveyi* in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. November, p. 61–70, 2019.

SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, n. 1–2, p. 125–139, 1994.

SONG, Z. X. et al. Dietary zinc deficiency reduced growth performance, intestinal immune and physical barrier functions related to NF- κ B, TOR, Nrf2, JNK and MLCK signaling pathway of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 497–523, 2017.

STANDEN, B. T. et al. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8403–8417, 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, n. June, p. 60–76, 2018.

TAN, L. N. et al. Growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary zinc. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 338–345, 2011.

TIAN, X. et al. Effects of dietary yeast β -glucans supplementation on growth performance, gut morphology, intestinal *Clostridium perfringens* population and immune response of broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, n. 2, p. 144–155, 2016.

TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA, H. J. et al. The effects of dietary yeast hydrolysate on growth, hematology, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 101, n. Nov., p. 168–175, 2020.

TORRECILLAS, S. et al. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 2, p. 674–681, 2011.

TORRECILLAS, S. et al. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1485–1495, 2013.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 525–544, 2014.

TRAN, N. T. et al. Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 283–298, 2020.

TRAN-NGOC, K. T. et al. Interaction between dissolved oxygen concentration and diet composition on growth, digestibility and intestinal health of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**, v. 462, p. 101-108, set. 2016.

TRUONG-TRAN, A. Q. et al. The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. **BioMetals**, v. 14, n. 2001, p. 315–330, 2001.

VALINI, G. A. C. et al. Dietary nucleotide supplementation as an alternative to in-feed antibiotics in weaned piglets. **Animal**, p. 100021, 2020.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 79–118, 1993.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annual Review of Physiology**, v. 68, p. 403–429, 2006.

WADA, M. et al. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, 2013.

WELLS, J. M. et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 3, p. G171–G193, 2017.

WU, W. et al. Dietary sodium butyrate improves intestinal development and function by modulating the microbial community in broilers. **PLoS ONE**, v. 13, n. 5, p. 1–21, 2018.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016.

ZHANG, Y. G. et al. Salmonella Infection Upregulates the Leaky Protein Claudin-2 in Intestinal Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 2013.

ZHAO, C.; TAN, S.; XIAO, X. Effects of Dietary Zinc Oxide Nanoparticles on Growth Performance and Antioxidative Status in Broilers. **Biological Trace Element Research**, v. 160, p. 361–367, 2014.

ZHOU, J. S. et al. Growth performance , lipid metabolism , and health status of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fed three different forms of sodium butyrate. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 287–298, 2019.

ZHOU, Q. C.; BUENTELLO, J. A.; GATLIN, D. M. Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). **Aquaculture**, v. 309, n. 1–4, p. 253–257, 2010.

ZOU, X. et al. Effects of sodium butyrate on intestinal health and gut microbiota composition during intestinal inflammation progression in broilers. **Poultry Science**, v. 98, p. 4449–4456, 2019.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta dissertação constitui parte de um projeto firmado entre a empresa Alltech Inc. (Nicholasville, Kentucky., EUA) e a Universidade Federal de Santa Catarina, sob coordenação da professora Débora Machado Fracalossi, que objetiva estudar os efeitos da inclusão de níveis crescentes de VILIGEN™ na dieta de juvenis de tilápias-do-nilo sobre algumas variáveis de interesse comercial.

Dentre os principais resultados encontrados nesta pesquisa, destaca-se que a altura das microvilosidades, assim como a macroestrutura do intestino, como maior desenvolvimento, menor fusão das pregas e lesões no tecido que apresentaram resposta quadrática ao aumento dos níveis de inclusão de VILIGEN™ na dieta de juvenis de tilápia-do-nilo, sugerindo que existe um efeito de dose-resposta entre a suplementação do aditivo, morfologia e integridade intestinal macroestrutural. A adequada morfologia e integridade dessas estruturas está diretamente associada a maior área de absorção (CEREZUELA et al., 2012; YUAN et al., 2020) e, conseqüentemente, maior transferência de nutrientes para corrente sanguínea, proporcionando melhor crescimento dos peixes. Desta forma, a inclusão de 2,50 g kg⁻¹ de VILIGEN™ na dieta demonstrou ser a mais adequada, promovendo melhor saúde intestinal. Tal resultado corrobora com o encontrado em outro estudo do nosso laboratório, onde o maior ganho em peso da tilápia-do-nilo foi estimado para a dose de 2,80 g kg⁻¹ de VILIGEN™ (PESSINI et al., 2021).

Por outro lado, as micrografias feitas pelo MET, não demonstraram influência da suplementação de VILIGEN™ sobre a integridade microestrutural, a qual poderia estar relacionada às adequadas condições de criação, sem a exposição a estressores ambientais e/ou dietéticos, mantendo assim a homeostase do intestino. Como sugestões para trabalhos futuros, recomendamos a avaliação da integridade microestrutural de peixes expostos algum estressor para confirmar melhor esta hipótese. Além do mais, a ausência do efeito de VILIGEN™ na proteína da junção oclusiva claudina-2 condizem com os resultados das imagens obtidas na MET. Os níveis encontrados dessa junção não afetaram a barreira física e a integridade microestrutural do intestino. No entanto, outros estudos serão necessários para fornecer mais informações sobre o efeito da inclusão do aditivo em outras estruturas importantes da barreira física intestinal, tais como algumas junções oclusivas de barreira, o muco e a microbiota intestinal.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO GERAL

- ABD EL-NABY, A. S. et al. Stimulatory effect of dietary butyrate on growth, immune response, and resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Aeromonas hydrophila* infection. **Animal Feed Science and Technology**, v. 254, p. 114212, jul. 2019.
- AJEANI, Y J.; MAXWELL, C. V.; OWENS, F. N. Whey yeast protein may outperform soybean meal protein in baby pig rations. **Feedstuffs**, v. 51, n. 50, p. 18-19, 1979.
- AKTER, M. N. et al. 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, 28 fev. 2016.
- ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Effect of feed contaminants on intestinal health of monogastric farm animals. In: NIEWOLD, T. (Ed.). **Intestinal health - Key to maximise growth performance in livestock**. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2015. p. 169–190.
- ALI, S. R. et al. Effect of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition, haematology and biochemical parameters of Asian seabass (*Lates calcarifer*). **Aquaculture Research**, v. 48, p. 899–908, 2017.
- AMORIM, M. et al. Nutritional ingredients from spent brewer's yeast obtained by hydrolysis and selective membrane filtration integrated in a pilot process. **Journal of Food Engineering**, v. 185, p. 42–47, set. 2016.
- AMPHAN, S. et al. Feeding-regimen of β -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 120–128, abr. 2019.
- ANDERSON, J. M.; VAN ITALLIE, C. M. Physiology and Function of the Tight Junction. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 2, p. a002584, 1 ago. 2009.
- ANDRADE, M. E. R. et al. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. **Clinical Nutrition**, v. 34, n. 6, p. 1080–1087, dez. 2015.
- APAJALAHTI, J. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential Opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 14, n. 2, p. 444–453, jul. 2005.
- ASADUZZAMAN, M. et al. Dietary supplementation of inosine monophosphate promotes cellular growth of muscle and upregulates growth-related gene expression in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 468, p. 297–306, fev. 2017.
- ASSIMAKOPOULOS, S. F. et al. The Role of the Gut Barrier Function in Health and Disease. **Gastroenterology Research**, v. 11, n. 4, p. 261–263, 2018.

- AYROZA, Luiz Marques da Silva. **Criação de tilápia-do-nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de Chavantes, rio Paranapanema, SP/PR**. 2009. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Programa de Pós-graduação em Aquicultura. Jaboticabal, 2009.
- AZEVEDO, R. V. et al. Dietary mannan oligosaccharide and *Bacillus subtilis* in diets for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 38, n. 4, p. 347–353, 2016.
- BAGNI, M. et al. Short- and long-term effects of a dietary yeast β -glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 18, n. 4, p. 311–325, 2005.
- BALTACI, A. K.; YUCE, K.; MOGULKOC, R. Zinc Metabolism and Metallothioneins. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 1, p. 22–31, 2018.
- BARROSO, R. M. et al. **Diagnóstico da cadeia de valor da tilapicultura no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2018.
- BEDFORD, A.; GONG, J. Implications of butyrate and its derivatives for gut health and animal production. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 151–159, 2018.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: The role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2–3, p. 101–107, 1998.
- BENTSEN, H. B. et al. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 160, n. 1–2, p. 145–173, jan. 1998.
- BISCHOFF, S. C. et al. Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. **BMC Gastroenterology**, v. 14, n. 1, p. 1–25, 2014.
- BOAS, Andréia Donizeti Chagas Vilas. **Suplementação de ácidos orgânicos em dietas para leitões na fase de creche**. 2014. Dissertação (Mestrado em Produção Animal Sustentável) - Programa de Pós-graduação em Produção animal Sustentável - Instituto de Zootecnia. Nova Odessa, 2014.
- BOOTH, I. R.; STRATFORD, M. Acidulants and low pH. In: RUSSELL, N. J.; GOULD, G. W. **Food preservatives**. 2.ed. New York: Springer, 2003. cap. 4 48-76.
- BRAZ, Débora Barbosa. **Acidificantes como alternativas aos antimicrobianos melhoradores do desempenho de leitões na fase de creche**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2007.
- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal β -glucans and mammalian immunity. **Immunity**, v. 19, n. 3, p. 311–315, 2003.
- BURNELL, T. W.; CROMWELL, G. L.; STAHLY, T. S. Effects of dried whey and copper sulfate on the growth responses to organic acid in diets for weanling pigs. **Journal of animal science**, v. 66, n. 5, p. 1100–1108, 1988.

BURY, N. R.; WALKER, P. A.; GLOVER, C. N. Nutritive metal uptake in teleost fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 1, p. 11–23, 2003.

CABIB, E.; ROBERTS, R.; BOWERS, B. Synthesis of the Yeast Cell Wall and its Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 763–793, 1982.

CAMILLERI, M. et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 24, n. 6, p. 503–512, 2012.

CAMPBELL, H. K.; MAIERS, J. L.; DEMALI, K. A. Interplay between tight junctions & adherens junctions. **Experimental Cell Research**, v. 358, n. 1, p. 39–44, set. 2017.

CANANI, R. B. et al. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 17, n. 12, p. 1519–1528, 2011.

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, jul. 2016.

CARR, W. E. S.; NETHERTON, J. C.; MILSTEAD, M. L. Chemoattractants of the shrimp, *Palaemonetes pugio*: Variability in responsiveness and the stimulatory capacity of mixtures containing amino acids, quaternary ammonium compounds, purines and other substances. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part A: Physiology**, v. 77, n. 3, p. 469–474, 1984.

CELI, P. et al. Gastrointestinal functionality in animal nutrition and health: New opportunities for sustainable animal production. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, n. Sep., p. 88–100, dez. 2017.

CELI, P. et al. Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health. **Animal Feed Science and Technology**, v. 250, n. February, p. 9–31, 2019.

CHEN, X. Q. et al. Effects of dietary hydrolyzed yeast (*Rhodotorula mucilaginosa*) on growth performance, immune response, antioxidant capacity and histomorphology of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 90, n. Apr., p. 30–39, 2019.

CHENG, Z.; BUENTELLO, A.; GATLIN, D. M. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 143–147, 2011.

CHIBA, H. et al. Transmembrane proteins of tight junctions. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 3, p. 588–600, 2008.

CLAUS, R.; GÜNTNER, D.; LETZGUSS, H. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 7–8, p. 312–318, 2007.

CLAYBURGH, D. R.; SHEN, L.; TURNER, J. R. A porous defense: The leaky epithelial barrier in intestinal disease. **Laboratory Investigation**, v. 84, n. 3, p. 282–291, 2004.

COLLETT, S. Nutrição, imunidade e produtividade. In: RONDA LATINO-AMERICANA O FUTURO DA ALIMENTAÇÃO, 10., 2000, Brasil. **Palestras...** Brasil: Alltech, 2000. p. 20-30.

CONWAY, P.L. Function and regulation of the gastrointestinal microbiota of the pig. In: VI th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIGESTIVE PHYSIOLOGY IN PIGS. 80., 1994, Dummerstorf, **Proceedings...** 1994. p. 231–240.

CRUZ, J. B. F.; SOARES, H. F. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 207–222, 2011.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 450 p.

DALMO, R. A.; BØGWALD, J. β -Glucans As Conductors of Immune Symphonies. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 25, n. 4, p. 384–396, 2008.

DAWOOD, M. A. O. et al. Dietary supplementation of β -glucan improves growth performance, the innate immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture Nutrition**, v. 23, n. 1, p. 148–159, 2017.

DAWOOD, M. A. O. et al. Dietary sodium butyrate ameliorated the blood stress biomarkers, heat shock proteins, and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to heat stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 88, n. Nov., p. 102500, 2020.

DE LANGE, C. F. M. et al. Strategic use of feed ingredients and feed additives to stimulate gut health and development in young pigs. **Livestock Science**, v. 134, n. 1–3, p. 124–134, 2010.

DEFOIRDT, T. et al. Short-chain fatty acids and poly- β -hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 6, p. 680–685, 2009.

DENNEHY, K. M.; BROWN, G. D. The role of the β -glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 2, p. 253–258, 2007.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453–463, 2002.

DIMITROGLOU, A. et al. 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.

DIMITROGLOU, A. et al. The Effect of Mannan Oligosaccharide Supplementation on Atlantic Salmon Smolts (*Salmo salar* L.) Fed Diets with High Levels of Plant Proteins. **Journal of Aquaculture Research & Development**, v. 1, 2011.

DRUMMOND, R. A.; BROWN, G. D. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 392–399, 2011.

EL-SAYED, A.-F. M. Current state and future potential. In: EL-SAYED, A.-F. M. (Ed.). **Tilapia Culture**. 2. ed. Elsevier, 2020. p. 1–20.

FARHADI, A. et al. Intestinal barrier : An interface between health and disease. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 18, n. July, p. 479–497, 2003.

FAURE, M. et al. Specific amino acids increase mucin synthesis and microbiota in dextran sulfate sodium-treated rats. **Journal of Nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1558–1564, 2006.

FAZANO, A. R. T. **Digestibilidade e valor biológico da proteína da levedura seca (Saccharomyces spp.) e do farelo de soja para coelhos**. 1986. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1986.

FIALHO, E. T.; ALBINO, L. F. T.; BLUME, E. Composição química e valores energéticos de alguns alimentos para suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 20, p. 1419, 1985.

FINAMORE, A. et al. Zinc deficiency induces membrane barrier damage and increases neutrophil transmigration in Caco-2 cells. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 9, p. 1664–1670, 2008.

FINDLEY, M. K.; KOVAL, M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. **IUBMB Life**, v. 61, n. 4, p. 431–437, 2009.

FLEMMING, José Sidney. **Utilização de levedura, probiótico e mananoligossacarídeo (MOS) na alimentação de frangos de corte**. 2005. Tese (Doutorado em Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -FAO. **The state of food and agriculture**. Rome, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals**. Rome, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2017/FAO annuaire. Statistiques des pêches et de l'aquaculture 2017/FAO anuario**. Rome, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020 - Sustainability in action**. Rome, 2020.

FRANCO, Luciana Gouvêa. **Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador de desempenho em frangos de corte**. 2009. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2009.

GIL, A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, n. 3, p. 1–4, 2002.

GOMEZ, D.; SUNYER, J. O.; SALINAS, I. The mucosal immune system of fish: The evolution of tolerating commensals while fighting pathogens. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 35, n. 6, p. 1729–1739, 2013.

GONZÁLEZ-MARISCAL, L. et al. Tight junction proteins. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 81, n. 1, p. 1–44, 2003.

GOOSSENS, T. Improving Gut Health Of Production Animals; Looking For Ways To Optimise Functional Feed Additives. **International Animal Health Journal**, v. 2, n. 4, p. 76–82, 2015.

GRIMBLE, G. K.; WESTWOOD, M. R. Nucleotides. In: **Nutrition and Immunology: principles and Practice**. Totowa: Humana Press. p. 135-144, 2000.

GUARDIOLA, F. A. et al. Comparative analysis of the humoral immunity of skin mucus from several marine teleost fish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 40, n. 1, p. 24–31, set. 2014.

GUERREIRO, I. et al. Probiotics effect on immune and hepatic oxidative status and gut morphology of white sea bream (*Diplodus sargus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 50, p. 168–174, mar. 2016.

GUILLOTEAU, P. et al. From the gut to the peripheral tissues: The multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 366–384, 2010.

GÜLTEPE, N. et al. Dietary supplementation with Mannanligosaccharides (MOS) from Bio-Mos enhances growth parameters and digestive capacity of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 5, p. 482–487, 2011.

GÜNZEL, D.; FROMM, M. Claudins and Other Tight Junction Proteins. In: **Comprehensive Physiology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012. v. 2p. 1819–1852.

GÜNZEL, D.; YU, A. S. L. Claudins and the Modulation of Tight Junction Permeability. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 2, p. 525–569, abr. 2013.

GUO, X. et al. Dietary nucleotides can directly stimulate the immunity of zebrafish independent of the intestinal microbiota. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, n. Dec., p. 1064–1071, 2019.

HAHOR, W.; THONGPRAJUKAEW, K.; SUANYUK, N. Effects of dietary supplementation of oligosaccharides on growth performance, gut health and immune response of hybrid catfish (*Pangasianodon gigas* × *Pangasianodon hypophthalmus*). **Aquaculture**, v. 507, n. Dec., p. 97–107, 2019.

HAMER, H. M. et al. Review article: The role of butyrate on colonic function. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 104–119, 2008.

HANSEN, J. T., Bioproteins in the feeding of growing – finishing pigs in Norway. I. Chemical composition, nutrient digestibility and protein quality of “Pruteen”, “Toprina”,

- “Pequilo” and a methanol-based yeast product (*Pichia aganobii*). **Z. Tierphysiol, Tierernahrg.u. Futtermittelkde**, v. 47, p. 35-42, 1981.
- HE, J. Y. et al. Methionine and lysine requirements for maintenance and efficiency of utilization for growth of two sizes of tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture Nutrition**, v. 19, n. 4, p. 629–640, 2013.
- HE, S. et al. 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.
- HERMES, R. G. Uso de extratos de plantas e acidificantes para suínos, o que diz a ciência e a prática atual. **Engormix**, 2011. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-suinocultura/nutricao/141-p0.htm>. Acesso em: 26 de março de 2020.
- HOSSAIN, M. S. et al. Dietary nucleotide administration influences growth, immune responses and oxidative stress resistance of juvenile red sea bream (*Pagrus major*). **Aquaculture**, v. 455, p. 41–49, mar. 2016.
- HOUGH, J.S. **Biología de la cerveza y de malta**. Zaragoza: Acribia, 1990. 194p.
- HU, C. et al. Diosmectite-zinc oxide composite improves intestinal barrier function, modulates expression of pro-inflammatory cytokines and tight junction protein in early weaned pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 110, p. 681–688, 2013.
- HUANG, F. et al. Dietary zinc requirement of adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed semi-purified diets, and effects on tissue mineral composition and antioxidant responses. **Aquaculture**, v. 439, p. 53–59, mar. 2015.
- HUIGE, N. Brewery By-Products and Effluents. In: STEWART, G. G.; PRIEST, F. G. (Eds.). **Handbook of Brewing**. 2. ed. [s.l: s.n.]. p. 655–713.
- HUTTENHOWER, C. et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.
- HUYBEN, D. et al. Haematological and intestinal health parameters of rainbow trout are influenced by dietary live yeast and increased water temperature. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 89, n. Apr., p. 525–536, 2019.
- ISHIDA, Y.; HIDAKA, I. Gustatory Response Profiles for Amino Acids, Glycinebetaine, and Nucleotides in Several Marine Teleosts. **Nippon Suisan Gakkaishi**, v. 53, n. 8, p. 1391–1398, 1987.
- JHA, R. et al. Dietary Fiber and Intestinal Health of Monogastric Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 6, n. Mar., p. 1–12, 4 mar. 2019.
- JL, L. et al. Effect of dietary β -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, maio 2017.

JIANG, L. et al. Butyric acid: Applications and recent advances in its bioproduction. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2101–2117, 2018.

JOHANSSON, M. E. V.; HANSSON, G. C. Immunological aspects of intestinal mucus and mucins. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 10, p. 639–649, 2016.

JOHNSON, R. W. Fueling the immune response: what's the cost? In: PATIENCE, J. F. (Ed.). **Feed Efficiency in Swine**. Wageningen Academic Publishers, 2012. p. 211–223.

JUTFELT, F. **The Intestinal Epithelium of Salmonids - Transepithelial Transport, Barrier Function and Bacterial Interactions**. Göteborg University, 2006.

JUTFELT, F. Barrier Function of the Gut. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. San Diego: Academic Press, 2011. v. 2p. 1322–1331.

KARLSEN, T. H. et al. Intestinal and systemic immune responses to an oral cholera toxoid B subunit whole-cell vaccine administered during zinc supplementation. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 3909–3913, 2003.

KEHL-FIE, T. E.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 2, p. 218–224, 2010.

KEYVANSHOKOOH, S.; TAHMASEBI-KOBYANI, A. Proteome modifications of fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle as an effect of dietary nucleotides. **Aquaculture**, v. 324–325, p. 79–84, 2012.

KIM, Y. S.; HO, S. B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, v. 12, n. 5, p. 319–330, 2010.

KIMURA, T.; KAMBE, T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: An overview and perspective. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 10–12, 2016.

KIRON, V. Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, p. 111–133, 2012.

KOGUT, M. H.; ARSENAULT, R. J. Editorial: Gut health: The new paradigm in food animal production. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. Aug., p. 10–13, 2016.

KOSIŃSKA, A.; ANDLAUER, W. Modulation of tight junction integrity by food components. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 951–960, 2013.

KRIDER, J. L.; CONRAD, J.H.; CARROLL, W.E. Swine Production 5^o Ed. **McGraw-Hill Book Company**, p. 679, 1982.

KRUG, S. M.; SCHULZKE, J. D.; FROMM, M. Tight junction, selective permeability, and related diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 36, p. 166–176, 2014.

KUHLWEIN, H. et al. Effects of a dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on

intestinal microbial communities and intestinal ultrastructure of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Applied Microbiology**, p. 1091–1106, 2013.

KÜHLWEIN, H. et al. Effects of dietary β -(1,3)(1,6)-D-glucan supplementation on growth performance, intestinal morphology and haemato-immunological profile of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 98, n. 2, p. 279–289, abr. 2014.

LALL, S. P.; TIBBETTS, S. M. Nutrition, Feeding, and Behavior of Fish. **Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice**, v. 12, n. 2, p. 361–372, 2009.

LAZADO, C. C.; CAIPANG, C. M. A. Mucosal immunity and probiotics in fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 39, n. 1, p. 78–89, 2014.

LERNER, A.; MATTHIAS, T. Changes in intestinal tight junction permeability associated with industrial food additives explain the rising incidence of autoimmune disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 14, n. 6, p. 479–489, 2015.

LERNER, A.; SHAMIR, R. **Nucleotides in infant nutrition: a must or an option**. *IMAJ*, v.2, p. 772-774, 2000.

LI, P.; GATLIN, D. M. Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. **Aquaculture**, v. 251, n. 2–4, p. 141–152, 2006.

LIEPMAN, A. H. et al. Functional genomic analysis supports conservation of function among cellulose synthase-like a gene family members and suggests diverse roles of mannans in plants. **Plant Physiology**, v. 143, n. 4, p. 1881–1893, 2007.

LIN, S. et al. Effects of dietary β -1,3-glucan, chitosan or raffinose on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 31, n. 6, p. 788–794, 2011.

LIN, S. et al. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, v. 406–407, p. 79–84, 2013.

LIU, B. et al. Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) under *Aeromonas hydrophila* infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1395–1403, 2013.

LOKESH, J. et al. Transcriptional regulation of cytokines in the intestine of Atlantic cod fed yeast derived mannan oligosaccharide or β -Glucan and challenged with *Vibrio anguillarum*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 33, n. 3, p. 626–631, 2012.

LU, J. J.; ZOU, X. T.; WANG, Y. M. Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microflora and morphology of weanling pigs. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 17, n. 4, p. 568–578, 2008.

LU, Z. Y. et al. Mannan oligosaccharides improved growth performance and antioxidant

capacity in the intestine of on-growing grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Aquaculture Reports**, v. 17, n. Feb., p. 100313, 2020.

LUETTIG, J. et al. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. **Tissue Barriers**, v. 3, n. 1, 2015.

LUZ, J. R. et al. Use of sodium butyrate in the feeding of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) juvenile. **Aquaculture**, v. 510, n. May, p. 248–255, 2019.

MACDONALD, R. S. The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 5, p. 1500S-1508S, 1 maio 2000.

MACHADO, P. F. **Valor nutritivo da levedura, resíduo da produção de álcool para vacas em lactação**. 1983. Tese - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1983.

MASLOWSKI, K. M.; MACKAY, C. R. Diet, gut microbiota and immune responses. **Nature Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–9, 2011.

MATTER, K.; BALDA, M. S. Signalling to and from tight junctions. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 3, p. 225–236, 2003.

MAZZONI, M. et al. Supplemental sodium butyrate stimulates different gastric cells in weaned pigs. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 8, p. 1426–1431, 2008.

MCDOWELL, L. R. **Minerals in animal and human nutrition**. 2 ed. Netherlands: Elsevier Science, 2003. 644 p.

MEENA, D. K. et al. Beta-glucan: An ideal immunostimulant in aquaculture (a review). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 431–457, 2013.

MICHIELAN, A.; D'INCÀ, R. Intestinal Permeability in Inflammatory Bowel Disease: Pathogenesis, Clinical Evaluation, and Therapy of Leaky Gut. **Mediators of Inflammation**, 2015.

MILES, R. D.; HENRY, P. R. Relative trace mineral bioavailability. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, n. 2, p. 73–92, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa 13 de 30 de novembro de 2004. Diário Oficial, 2004.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução Normativa nº 44 de 15 de dezembro de 2015. Diário Oficial, 2015.

MIRGHAED, A. T. et al. Dietary sodium butyrate (Butirex® C4) supplementation modulates intestinal transcriptomic responses and augments disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 92, n. Apr., p. 621–628, 2019.

MISRA, C. K. et al. Effect of long term administration of dietary β -glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture**, v. 255, n. 1–4, p. 82–94, 2006.

MITIC, L. L.; VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: Lessons from mutant animals and proteins. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 279, n. 2, p. 250–254, 2000.

MODINA, S. C. et al. Nutritional regulation of gut barrier integrity in weaning piglets. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1–15, 2019.

MOESER, A. J.; POHL, C. S.; RAJPUT, M. Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 313–321, 2017.

MOMENI-MOGHADDAM, P. et al. Effects of mannan oligosaccharide supplementation on growth, some immune responses and gut lactic acid bacteria of common carp (*Cyprinus Carpio*) fingerlings. **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 6, n. 3, p. 239–44, 2015.

MOREIRA, J. R. A. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento**. 1984. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1984.

MULDER, I. E.; WADSWORTH, S.; SECOMBES, C. J. Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 4, p. 747–759, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Artmed, 2014.

NG, W. K.; KOH, C. B. The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. **Reviews in Aquaculture**, v. 9, n. 4, p. 342–368, 2017.

NIEVES-RODRÍGUEZ, K. N. et al. Effect of β -glucans in diets on growth, survival, digestive enzyme activity, and immune system and intestinal barrier gene expression for tropical gar (*Atractosteus tropicus*) juveniles. **Fishes**, v. 3, n. 3, p. 1–13, 2018.

NIKLASSON, L. **Intestinal Mucosal Immunology of Salmonids. Response to Stress and Infection and Crosstalk with the Physical Barrier**. 2013. Thesis (Department of Biological and Environmental Sciences) University of Gothenburg. Sweden, 2013.

NIKOLAKOPOULOU, K.; ZARKADIS, I. K. Molecular cloning and characterisation of two homologues of Mannose-Binding Lectin in rainbow trout. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 21, n. 3, p. 305–314, 2006.

OECD/FAO (2019), **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028**, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

O'HARA, J. R.; BURET, A. G. Mechanisms of intestinal tight junctional disruption during infection. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 7008–7021, 2008.

ONRUST, L. et al. Steering endogenous butyrate production in the intestinal tract of broilers

- as a tool to improve gut health. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. Dec., p. 1–8, 2015.
- OYOFO, B. A. et al. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. **Poultry science**, v. 68, n. 10, p. 1357–1360, 1989.
- PARDO-GAMBOA, B. S. et al. Nutrientes digestíveis da Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) Íntegra e Autolisada para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Vet. Zootec.**, v. 5, n. 1, p. 26–38, 2011.
- PARIPATANANONT, T.; LOVELL, R. T. Chelated zinc reduces the dietary zinc requirement of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 133, n. 1, p. 73–82, 1995.
- PARRA, D.; REYES-LOPEZ, F. E.; TORT, L. Mucosal immunity and B cells in teleosts: Effect of vaccination and stress. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. Jun., p. 1–12, 2015.
- PARTANEN, K. H.; MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. **Nutrition Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 117–145, 1999.
- PAULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast β -glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23–37, 2001.
- PEIXE BR. Anuário 2021 Peixe BR da Piscicultura. **Associação Brasileira de Piscicultura**, p. 1–71, 2021.
- PELICANO, E. et al. Carcass and cut yields and meat qualitative traits of broilers fed diets containing probiotics and prebiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 3, p. 169–175, 2005.
- PESSINI, J. E. et al. Dietary supplementation of ViligenTM to Nile tilapia improves growth and gut morphology. **Aquaculture Nutrition**, n. July 2020, p. anu.13247, 30 mar. 2021.
- PILARSKI, F. et al. Different β -glucans improve the growth performance and bacterial resistance in Nile tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 70, p. 25–29, 2017.
- PILLAY, T.V.R. **Aquaculture Principles and Practices**. Oxford: Fishing News Books, 1990. p. 575.
- PIRARAT, N., BOONANANTHANASARN, S., KRONGPONG, L., KATAGIRI, T., MAITA, M. Effect of activated charcoal-supplemented diet on growth performance and intestinal morphology of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- POHLENZ, C.; GATLIN, D. M. Interrelationships between fish nutrition and health. **Aquaculture**, v. 431, p. 111–117, 2014.
- POWELL, D. W. Barrier function of epithelia. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 241, n. 4, p. G275–G288, 1 out. 1981.

- RAFACZ-LIVINGSTON, K.A.; PARSONS, C.M.; JUNGKT, R.A. The effects of various organic acids on phytate phosphorus utilization in chicks. **Poultry Science**, Champaign, v.84, p.1356-1362, 2005.
- RAHAR, S. et al. Preparation, characterization, and biological properties of β -glucans. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 94, 2011.
- RAI, A. K.; PANDEY, A.; SAHOO, D. Biotechnological potential of yeasts in functional food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 83, n. Nov., p. 129–137, 2019.
- RAVINDRAN, V.; KORNEGAY, E. T. Acidification of weaner pig diets: A review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 62, n. 4, p. 313–322, 1993.
- REDA, R. M. et al. Effect of dietary yeast nucleotide on antioxidant activity, non-specific immunity, intestinal cytokines, and disease resistance in Nile Tilapia. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 80, n. June, p. 281–290, 2018.
- REED, G.; NAGODAWITHANA, T. W. **Yeast technology**. 2. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1991.
- REFSTIE, S. et al. Effects of dietary yeast cell wall β -glucans and MOS on performance, gut health, and salmon lice resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed sunflower and soybean meal. **Aquaculture**, v. 305, n. 1–4, p. 109–116, 2010.
- REN, Z. et al. Effects of dietary mannan oligosaccharide supplementation on growth performance, antioxidant capacity, non-specific immunity and immune-related gene expression of juvenile hybrid grouper (*Epinephelus lanceolatus* ♂ \times *Epinephelus fuscoguttatus* ♀). **Aquaculture**, v. 523, n. Mar., p. 735195, 2020.
- RINGØ, E. et al. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. **Aquaculture**, v. 268, n. 1–4, p. 251–264, 2007.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; RAA, J. Enhancement of non-specific disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., by a glucan from *Saccharomyces cerevisiae* cell walls. **Journal of Fish Diseases**, v. 9, p. 391–400, 1990.
- ROBERTSEN, B.; ENGSTAD, R.; JORGENSEN, J.B.B Glucans as immunostimulants in fish. In: STOLEN, J., FLETCHER, T.C. (Eds.) **Modulators of fish immune responses**. Fair Haven, NJ: SOS Publications, 1994. p.83-99.
- ROBINSON, K. et al. Regulation of the intestinal barrier function by host defense peptides. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, n. Nov., p. 1–17, 2015.
- ROCHA, A. P. T. et al. Cinética de produção de levedura seca em leite de jorro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, n. 1, p. 81–86, 2008.
- RODRIGUES, F. A. DE P. et al. Fisiologia da barreira epitelial intestinal. In: ORIÁ, R. B.; BRITO, G. A. D. C. (Eds.). **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**. São Paulo: Blucher, 2016. p. 441–440.

ROMBOUT, J. H. W. M.; YANG, G.; KIRON, V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 40, n. 2, p. 634–643, 2014.

ROSE, A. H. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 110S-118S, 1993.

ROSSI, P.; XAVIER, E. G.; RUTZ, F. NUCLEOTÍDEOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL. **R. Bras. Agrociência**, v. 13, n. 1, p. 5–12, 2007.

SAKAI, M. et al. Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. **Journal of Fish Diseases**, v. 24, n. 8, p. 433–438, 2001.

SAKAKIBARA, A. et al. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. **Journal of Cell Biology**, v. 137, n. 6, p. 1393–1401, 1997.

SALGUEIRO, M. J. et al. Zinc status and immune system relationship. **Biological Trace Element Research**, v. 76, n. 3, p. 193–205, 2000.

SALINAS, I.; MAGADÁN, S. Omics in fish mucosal immunity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 75, n. 2017, p. 99–108, 2017.

SAUER, N. et al. The effects of pure nucleotides on performance, humoral immunity, gut structure and numbers of intestinal bacteria of newly weaned pigs. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 9, p. 3126–3134, 2012.

SCALDAFERRI, F. et al. The Gut Barrier: New Acquisitions and Therapeutic Approaches. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 46, n. Oct., p. S12–S17, out. 2012.

SCHROERS, V. et al. Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). **Aquaculture**, v. 288, n. 3–4, p. 184–189, 2009.

SEAL, B. S. et al. Alternatives to antibiotics: a symposium on the challenges and solutions for animal production. **Animal health research reviews**, v. 14, n. 1, p. 78–87, 2013.

SEKIROV, I. et al. Gut microbiota in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 90, n. 3, p. 859–904, 2010.

SHEIKHZADEH, N. et al. Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 6, p. 1083–1087, 2012.

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, n. June, p. 60–76, 2018.

SILVA, A. P. Pesca artesanal brasileira. Aspectos conceituais, históricos, institucionais e prospectivos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa, Palmas, n. 1, p. 32, 2014.

- SINGH, S.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Mannans: An overview of properties and application in food products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 79–95, 2018.
- SIQUEIRA, T. V. Aquicultura: a nova fronteira para aumentar a produção mundial de alimentos de forma sustentável. **Boletim regional, urbano e ambiental**, v. 25, p. 119–170, 2018.
- SIRIMANAPONG, W. et al. The effects of feeding immunostimulant β -glucan on the immune response of *Pangasianodon hypophthalmus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 45, n. 2, p. 357–366, 2015.
- SIWICKI, A. K.; ANDERSON, D. P.; RUMSEY, G. L. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 41, n. 1–2, p. 125–139, 1994.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C. B. Química Orgânica, 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 474 p.
- SONG, Z. X. et al. Dietary zinc deficiency reduced growth performance, intestinal immune and physical barrier functions related to NF- κ B, TOR, Nrf2, JNK and MLCK signaling pathway of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 66, p. 497–523, 2017.
- STANDEN, B. T. et al. Modulation of the intestinal microbiota and morphology of tilapia, *Oreochromis niloticus*, following the application of a multi-species probiotic. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8403–8417, 2015.
- STEWART, A. S.; PRATT-PHILLIPS, S.; GONZALEZ, L. M. Alterations in Intestinal Permeability: The Role of the “Leaky Gut” in Health and Disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 52, p. 10–22, 2017.
- STONE, C.W. Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals. **Engormix**, 11 de junho de 2006. Disponível em: <https://en.engormix.com/feed-machinery/articles/yeast-products-in-feed-industry-t33489.htm>. Acessado em: 03 de outubro de 2020.
- SUNDH, H.; SUNDELL, K. S. Environmental impacts on fish mucosa. In: BECK, B. H.; PEATMAN, E. (Eds.). **Mucosal Health in Aquaculture**. Elsevier, 2015. p. 171–197.
- SUZUKI, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 4, p. 631–659, 2013.
- TAHMASEBI-KOHYANI, A. et al. Dietary administration of nucleotides to enhance growth, humoral immune responses, and disease resistance of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 30, n. 1, p. 189–193, 2011.
- TAN, L. N. et al. Growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) fed graded levels of dietary zinc. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 3, p. 338–345, 2011.

TAPIERO, H.; TEW, K. D. Trace elements in human physiology and pathology: Zinc and metallothioneins. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 57, n. 9, p. 399–411, 2003.

TIE, H. et al. Dietary nucleotides supplementation affect the physicochemical properties, amino acid and fatty acid constituents, apoptosis and antioxidant mechanisms in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) muscle. **Aquaculture**, v. 502, p. 312–325, 2019.

TIMOTHÉE ANDRIAMIALINIRINA, H. J. et al. The effects of dietary yeast hydrolysate on growth, hematology, antioxidant enzyme activities and non-specific immunity of juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 101, n. Nov., p. 168–175, 2020.

TORRECILLAS, S. et al. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, n. 5, p. 969–981, 2007.

TORRECILLAS, S. et al. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. 223–233, 2011.

TORRECILLAS, S. et al. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, n. 6, p. 1485–1495, 2013.

TORRECILLAS, S.; MONTERO, D.; IZQUIERDO, M. Improved health and growth of fish fed mannan oligosaccharides: Potential mode of action. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 36, n. 2, p. 525–544, 2014.

TRAN, N. T. et al. Progress and perspectives of short-chain fatty acids in aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 12, n. 1, p. 283–298, 2020.

TSUKITA, S.; FURUSE, M. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 531–536, 2002.

TSUKITA, S.; TANAKA, H.; TAMURA, A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 2, p. 141–152, 2019.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 799–809, 2009.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 79–118, 1993.

VANANUVAT, P. Value of yeast protein for poultry feeds. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 9, p. 325–343, 1977.

VAN IMMERSEEL, F. et al. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 1, p. 69–74, 2004.

VAN ITALLIE, C. M.; ANDERSON, J. M. Claudins and epithelial paracellular transport.

Annual Review of Physiology, v. 68, p. 403–429, 2006.

VIEIRA, E.; CUNHA, S. C.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. Characterization of a Potential Bioactive Food Ingredient from Inner Cellular Content of Brewer's Spent Yeast. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 11, p. 3235–3242, 2019.

WADA, M. et al. Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na⁺ flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition. **Gastroenterology**, v. 144, n. 2, p. 369–380, 2013.

WELLS, J. M. et al. Homeostasis of the gut barrier and potential biomarkers. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 312, n. 3, p. G171–G193, 2017.

WILLIAMS, L. A. et al. Identification and characterization of human junctional adhesion molecule (JAM). **Molecular Immunology**, v. 36, n. 17, p. 1175–1188, 1999.

WILLING, B. P.; VAN KESSEL, A. G. Host pathways for recognition: Establishing gastrointestinal microbiota as relevant in animal health and nutrition. **Livestock Science**, v. 133, n. 1–3, p. 82–91, 2010.

WITTIG, B. M.; ZEITZ, M. The gut as an organ of immunology. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 18, n. 3, p. 181–187, 2003.

WU, Y. P. et al. Influence of dietary zinc on muscle composition, flesh quality and muscle antioxidant status of young grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). **Aquaculture Research**, v. 46, n. 10, p. 2360–2373, 2015.

YAMADA, E. A. et al. Utilização de extrato de levedura (*Saccharomyces sp.*) de destilaria de álcool em salsicha. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, p. 197–204, 2010.

YOUSRI, R. F. Single cell protein: its potential use for animal and human nutrition. **World Review of Animal Production**, v. 18, p. 49-67, 1982.

ZANIBONI FILHO, E. Piscicultura das espécies exóticas de água doce. In: POLI, Carlos Rogério et al (Org.). **Aquicultura: Experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 337-368.

ZANUTTO, Carlos Alexandre. **Utilização de levedura de recuperação (*Saccharomyces spp.*) seca por “spray-dry” ou por rolo rotativo na alimentação de leitões na fase inicial**. 1997. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 1997.

ZEISSIG, S. et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. **Gut**, v. 56, n. 1, p. 61–72, 2007.

ZHANG, B. et al. Zinc prevents *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-induced loss of intestinal mucosal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 41, n. 4, p. 361–367, 2012.

ZHANG, B.; GUO, Y. Supplemental zinc reduced intestinal permeability by enhancing occludin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) expression in weaning piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 5, p. 687–693, 2009.

ZHANG, J. X. et al. Soybean β -Conglycinin Induces Inflammation and Oxidation and Causes Dysfunction of Intestinal Digestion and Absorption in Fish. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–12, 2013.

ZHOU, C. et al. Effect of dietary sodium butyrate on growth performance, enzyme activities and intestinal proliferation-related gene expression of juvenile golden pompano *Trachinotus ovatus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 25, n. 6, p. 1261–1271, 2019.

ZHOU, M. et al. Effects of brewer's yeast hydrolysate on the growth performance and the intestinal bacterial diversity of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 484, n. Oct., p. 139–144, 2018.

ZIHNI, C. et al. Tight junctions: From simple barriers to multifunctional molecular gates. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 564–580, 2016.