UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQÜICULTURA

Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho

Róberson Sakabe
Zootecnista – Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo
2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQÜICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho

Róberson Sakabe

Orientador: Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes
Co-Orientadora: Fabiana Pilarski

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Aqüicultura da UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura, na área de Concentração em Aqüicultura.

Jaboticabal - São Paulo
Março de 2007

Sakabe, Róberson
S158s Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho / Róberson Sakabe. – – Jaboticabal, 2007
xi, 63 f.: il.; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura, 2007
Orientador: Flávio Ruas de Moraes
Banca examinadora: Ana Lúcia Salaro, Margarida Maria Barros
Bibliografia

1. Ácidos graxos essenciais. 2. *Oreochromis niloticus*. 3. Inflamação granulomatosa. 4. Desempenho produtivo e hematológico I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aqüicultura.

CDU 639.3.09

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus que sempre me acompanha nessa vida, me apoiando nas vitórias e derrotas e me ensinando todos os dias novas lições de vida. Obrigado sincero pelas oportunidades que recebo e por tudo que compreende minha vida desde as coisas mais simples até as mais importantes.

E é claro dedico especialmente a minha família, minha vida, meu orgulho, meu porto seguro, onde encontro o melhor exemplo para me espelhar. Aos meus pais que sempre me apoiaram incondicionalmente em minha formação pessoal e profissional. A Edna, Edson, Lucy que também torcem muito por mim e é claro aos meus sobrinhos Kenzinho e Júlia as maiores alegrias da nossa grande família.

AGRADECIMENTOS:

Ao professor Flávio Ruas de Moraes pela orientação e amizade. Primeiramente muito obrigado pela oportunidade de crescimento na vida acadêmica, orientando com maestria mais esse orientado. Pelo incentivo e força aliados a sua experiência profissional que souberam ministrar corretamente a minha ansiedade e inexperiência. E é claro a amizade formada durante esse período fundamentais para o sucesso dessa parceria.

A minha amiga e co-orientadora Fabiana Pilarski que eu tive o prazer em conhecer durante o meu mestrado. Uma pessoa muito especial que tenho grande admiração e consideração. Muito obrigado Fabiana Pilarski.

Aos pós-graduandos Daniela Nomura, Fabiana Bozzo, Nilton Ishikawa (Paraca), Jaime Fenerick, Marcelo Pardi de Castro (Bird), Edsandra, Rogério pela amizade e imensa ajuda durante as coletas.

Ao profº. Rodrigo Yudi Fujimoto pela amizade e colaboração no trabalho.

Ao profº Marco Antônio de Andrade Belo pela amizade e ajuda fundamental no processo cirúrgico do implante das lamínulas no tecido do subcutâneo das tilápias.

A Lara Wichr Genovez e Gabriela Gomes Roncada pela amizade, força e auxílio durante todas as coletas.

Aos estagiários e amigos Fernanda, Maurício, Alexandre, Cléber, Luís (Peru), Ricardo, Luís, Emy, Carol, Fábio, Juliana e toda a família LAPOA.

Aos amigos feitos durante as disciplinas cursadas na pós-graduação: Haluko, Susy, Ana (Nutrição), Altevir, Cleujosi, Valéria, Ayroza, Casaca, Munir, Aike, Jaqueline, Francileide.....

Um obrigado mais que especial a Veralice, Michelle, Daniel, Deise, Lívia e Silvar pela amizade e imensa ajuda sempre que necessária.

A profª. Margarida Maria Barros e o profº. Luis Edivaldo Pezzato por fazerem parte da banca de qualificação assim como a profª. Margarida Maria Barros e a profª. Ana Lúcia Salaro minha eterna orientadora por

fazerem parte da banca de defesa de mestrado. Muito obrigado pela amizade e fico mais que honrado e muito agradecido pela disponibilidade da participação e indiscutível enriquecimento do trabalho.

Ao pessoal da Fábrica de ração (sr. Osvaldo, Sandra e Hélio) pela ajuda na confecção das dietas experimentais.

Aos funcionários da CAUNESP: sr. Mauro, Valdecir, Maurício, Márcio, Júnior, Dª Ana, Fátima, Elissandra e Silvinha pela força e grande ajuda durante todo o período da pós-graduação.

Ao profº. Gener Tadeu Pereira, pelo auxílio na análise estatística.

As técnicas Francisca de Assis Ardisson e Maria Inês Yamazaki de Campos do Laboratório de Histopatologia, Depto de Patologia da FCAV, Unesp pelo auxílio na confecção e processamento das lamínulas.

Aos professores das disciplinas cursadas durante a pós-graduação e que muito contribuíram para o enriquecimento da minha formação acadêmica e profissional.

A FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado e o auxílio à pesquisa do nosso projeto (Processo nº 05/53603-8 e nº 2006/55065-6).

As tilápias que fizeram parte do trabalho e cooperaram bastante para a realização dessa pesquisa.

Aos amigos da academia e das baladas que muito contribuíram para os momentos de entretenimento importantes para uma vida saudável.

Quero me desculpar de antemão das pessoas aqui não citadas, mas que também contribuíram para o sucesso dessa etapa. Mais uma vez muito obrigado a todos que fizeram não só parte do trabalho do mestrado como também fizeram parte dessa importante fase da minha vida.

"Feliz é aquele que sabe ao certo o que procura,
porque quem não sabe o que procura,
não vê o que encontra"
Claude Bernard

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO *01*

2 . REVISÃO DE LITERATURA *04*

2.1. *Efeito dos ácidos graxos essenciais em peixes* *04*

2.2. *Gigantócitos e Granulomas em Peixes* *11*

3. OBJETIVOS *14*

4. MATERIAL E MÉTODOS *15*

4.1. *Peixes e acondicionamento* *15*

4.2. *Delineamento Experimental* *16*

4.3. *Balanceamento da ração e suplementação com ácidos graxos essenciais* *17*

4.4. *Perfil dos ácidos graxos ácidos graxos essenciais* *18*

4.5. *Manejo dos peixes* *19*

4.6. *Monitoramento da qualidade de água* *19*

4.7. *Desempenho zootécnico* *20*

4.8. *Procedimento cirúrgico da Implantação da lamínula* *20*

4.8.1. *Anestesia dos peixes* *20*

4.8.2. *Implante da lamínula*..... *21*

4.8.3. *Sacrifício, colheita, fixação e coloração das lamínulas*..... *22*

4.9. *Parâmetros hematológicos*..... *25*

4.10. *Análise estatística*..... *26*

5. ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***..... *27*

5.1. *Perfil de ácidos graxos nas dietas experimentais*..... *27*

5.2. *Monitoramento da qualidade de água*..... *30*

5.3. *Parâmetros de desempenho produtivo*..... *32*

5.4. *Parâmetros hematológicos*..... *35*

5.5. *Estudo da cinética de macrófagos sobre a resposta inflamatória*..... *40*

6 **CONCLUSÕES**..... *52*

7. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**..... *53*

LISTA DE TABELAS

Págs.

Tabela 1. *Distribuição dos peixes nos diferentes tratamentos..... 16*

Tabela 2. *Composição percentual e análise químico-bromatológica da dieta)..... 18*

Tabela 3. *Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais obtidas por meio da análise cromatográfica..... 27*

Tabela 4. *Valores médios e desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água dos aquários avaliados durante período experimental.... 31*

Tabela 5. *Valores médios, erro padrão e o resultado da análise de variância do ganho de peso (GP), consumo (kg), conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções..... 32*

Tabela 6. *Valores médios, erro padrão e o resultado da análise de variância do número de eritrócitos (Erit) e percentual de hematócrito (Htc) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções..... 38*

Tabela 7. *Valores médios, erro padrão e o resultado da análise de variância da taxa de hemoglobina (Hg) e volume globular médio (MCV) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções..... 39*

Tabela 8. *Valores médios transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância das contagens de células nas lamínulas no dia 02 e 04 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... 40*

Tabela 9. *Valores médios transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância das contagens de células nas lamínulas no dia 06 e 08 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... 41*

LISTA DE FIGURAS

Págs.

Figura 1. *Caixas experimentais do LAPOA/ CAUNESP..... 16*

Figura 2. *Incisão dorso lateral esquerda da tilápia..... 23*

Figura 3. *Divulsiomento do tecido do subcutâneo..... 23*

Figura 4. *Implante da lamínula..... 24*

Figura 5. *Sutura da ferida cirúrgica após o implante da lamínula..... 24*

Figura 6. *Tilápia submetida ao implante da lamínula no tecido do subcutâneo..... 25*

Figura 7. *Presença de macrófagos (M), pequenos policariontes (P) e gigantócitos (G)..... 49*

Figura 8. *Gigantócitos tipo Langhans (L)..... 49*

Figura 9. *Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas dois dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... 50*

Figura 10. *Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... 50*

Figura 11. *Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas seis dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... 51*

Figura 12. Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta..... *51*

Suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais para tilápias do Nilo: desempenho produtivo, hematológico e granuloma por corpo estranho

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais sobre o desempenho produtivo, variáveis hematológicas, acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de tilápias. Foram distribuídos 300 peixes (69,86 ± 5,01 g) em 20 caixas (15 peixes/caixa), com capacidade para 310 L, abastecidas com água corrente, vazão de um litro/minuto e aeração suplementar. Os peixes foram submetidos a cinco dietas contendo 28% PD e 3200 Kcal ED/kg. Foram utilizadas duas fontes de ácidos graxos essenciais: óleo de soja (OS) e óleo de linhaça (OL) nas proporções de 100% OS, 75% OS + 25% OL, 50% OS + 50% OL, 25% OS + 75% OL e 100% OL, com quatro repetições por tratamento. Após 15 dias de aclimatação, os peixes receberam as dietas experimentais durante quatro meses, duas vezes ao dia, correspondente a 3,0% da biomassa. Mensalmente foi realizada biometria dos peixes para avaliar o desempenho produtivo. Após 120 dias, os animais foram submetidos ao implante das lamínulas no tecido subcutâneo para avaliação da resposta inflamatória e das variáveis hematológicas (número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito, taxa de hemoglobina e volume globular médio) dois, quatro, seis e oito dias após o implante. Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos para os parâmetros de desempenho produtivo e hematológico. Quanto à cinética dos macrófagos e formação de gigantócitos por corpo estranho foi observado crescente acúmulo em função do tempo de implante entre os tratamentos, precocidade na formação de gigantócitos tipo Langhans para os peixes alimentados com 100% de óleo de linhaça ao sexto dia ($P<0,0001$), enquanto que no oitavo dia houve a formação acentuada de gigantócitos tipo Langhans ($P<0,0001$) nas lamínulas implantadas nos peixes dos tratamentos (OS:OL) 50:50, 25:75 e 0:100. Desta forma pode-se inferir que a suplementação com fontes de ácidos graxos essenciais n-6 (OS) e n-3 (OL) na dieta para tilápia do Nilo incrementou a resposta inflamatória crônica pelo acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos, células de Langhans nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo.

Palavras-chave: ácidos graxos essenciais; *Oreochromis niloticus,* inflamação granulomatosa, desempenho produtivo, hematologia.

Alimentary supplementation with essentials fatty acids for Nile tilapia: productive, hematological performance and granuloma for strange body

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of the alimentary supplementation with essentials fatty acids on the productive performance, hematological variables, accumulation of macrophages and formation of giant cells in coverslips of glass implanted in the subcutaneous connective tissue of tilápias. 300 fish were distributed (69,86±5.01 g) in 20 aquariums (15 fishes/aquarium), with capacity for 310 L, supplied with current water, flow of one liter/minute and supplemental aeration. The fish was submitted the five diets contend 28% PD and 3200 Kcal ED/kg. Two acid sources of essentials fatty acids were used: soybean oil (SO) and linseed oil (LO) in the ratios of 100% SO, 75% SO + 25% LO, 50% SO + 50% LO, 25% SO + 75% LO and 100% LO, with four repetitions for treatment. After 15 days of acclimatization, the fish was received the experimental diets during four months, two times/day, correspondent 3.0% of the biomass. Monthly biometry of the fish was carried through to evaluate the productive performance. After 120 days, the animals were submitted to the implantation of coverslips in the subcutaneous connective tissue for evaluation of the inflammatory response and hematological variables (number of erythrocytes, percentage of haematocrit, tax of hemoglobin and average corpuscular volume) two, four, six and eight days after the implantation. Significant difference was not observed ($P>0,05$) between the treatments for the parameters of productive and hematological performance. All that to kinetic of the macrophages and the formation of giants cells for strange body increasing accumulation in function of the time of implantation between the treatments was observed, premature in the formation of giants cells Langhans type for fish fed with 100% of linseed oil to sixth day ($P<0,0001$), while that in the eighth day it had the accented formation of giant cell Langhans type ($P<0,0001$) in coverslips implanted in the fish of treatments (SO:LO) 50:50, 25:75 and 0:100. Of this form it can be inferred that the supplementation with acid sources of essentials fatty acids n-6 (SO) and n-3 (LO) in the diet for Nile tilápia developed the chronic inflammatory response for the accumulation of macrophages and formation of giants cells, cells of Langhans in coverslips implanted in the subcutaneous connective tissue.

Keywords: essentials fatty acids, *Oreochromis niloticus*, granulomatous inflammation, productive performance, hematology.

1. INTRODUÇÃO

Para atender a demanda crescente de proteína de origem animal de qualidade, a atividade aquícola vem se desenvolvendo e intensificando por meio da adoção de novas tecnologias de manejo e nutrição. Todavia, com a tecnificação das pisciculturas nacionais, a criação de peixes em alta densidade, utilizando rações balanceadas e manejo cada vez mais intensivo fez-se com que a incidência de doenças em peixes tornam-se cada vez mais recorrente.

Desta forma, estudos que viabilizam a criação intensiva de peixes visando melhorar não só os parâmetros zootécnicos, mas também a saúde destes animais, vêm se aprimorando nos últimos anos no sentido de atender o mercado cada vez mais exigente e competitivo. Dentre essas novas linhas de pesquisa, destacam-se aquelas que imprimem à nutrição não só as funções de atender as necessidades fisiológicas de crescimento, manutenção e reprodução dos peixes, mas também a sanidade desses animais.

Nos últimos anos, vêm sendo estudados alguns grupos de compostos comumente utilizados na alimentação de peixes que, quando adicionados à dieta, favorecem a resposta imunológica. Tais substâncias denominadas imunoestimulantes têm perspectivas promissoras para o manejo sanitário, pois atuam como coadjuvantes na quimioterapia e podem ser usados na prevenção de doenças (SAKAI, 1999).

Os ácidos graxos essenciais poliinsaturados podem ser inclusos nessa categoria já que dentre as suas funções, pode-se destacar sua ação sobre o sistema imunológico e ação antiinflamatória competindo com os medidores da inflamação além daqueles relacionados com o desempenho produtivo. No entanto, os ácidos graxos essenciais são sintetizados de forma limitada pelos peixes e devem ser fornecidos na dieta para suprir suas exigências. De maneira geral, observam-se que as exigências nutricionais em ácidos graxos essenciais variam com a espécie e tamanho do peixe, com a temperatura da água e com as fontes de alimento natural presentes no ambiente. Em geral os peixes de água doce

necessitam tanto do ácido linolêico (n-6) como do ácido linolênico (n-3) na dieta (PEZZATO *et al*., 2004).

A deficiência destes ácidos graxos essenciais, ou de seus precursores causa diminuição no crescimento, piora na conversão alimentar, aumento da taxa de mortalidade, aumento de líquido nos músculos, ulcerações nas nadadeiras, degeneração gordurosa no fígado, aumento da taxa respiratória e prejuízo na eritropoiese (MABÍLIA, 2005).

Vários pesquisadores têm desenvolvido estudos relacionados aos efeitos de fatores nutricionais e anti-nutricionais sobre o desempenho produtivo e sobre os mecanismos de defesa orgânica em modelos de estudo de inflamação e infecção em peixes teleósteos de interesse zootécnico (MARTINS, 2000; PETRIC, 2000, PETRIC *et al*., 2003 a,b; BELO, 2002, BRUM 2003; FUJIMOTO, 2004; GARCIA, 2005, BELO, 2006). Os resultados desses estudos corroboram para o desenvolvimento da atividade aqüícola fornecendo informações de suma importância e de aplicação prática atentando à profilaxia e prevenção de enfermidades, assim como desempenho zootécnico e custos de produção.

Lesões inflamatórias crônicas granulomatosas de diversas origens podem apresentar em seu substrato as células multinucleadas cujo significado ainda não é bem compreendido. Essas células formam-se pela fusão das membranas de macrófagos e são dependentes do recrutamento de monócitos do sangue, que por sua vez, são requeridos nos compartimentos de reserva e na taxa de renovação do granuloma (RYAN e SPECTOR, 1970). Neste contexto, BIRMAN e MARIANO (1985) demonstraram que a formação das células gigantes depende do agente e natureza do processo inflamatório, corroborando com a idéia de taxa de renovação macrofágica dentro da lesão.

Resultados demonstram que em juvenis de pacus *Piaractus mesopotamicus*, assim como em camundongos, hamsters e galinhas, ocorrem à formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo após três dias e que a suplementação da dieta com 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração induz aumento no número de macrófagos policariontes e número de núcleos/gigantócito formado e acelera a transformação de células do

tipo corpo estranho em células de Langhans (PETRIC, 2003b). Efeito semelhante foi observado por BELO *et al*. (2005) que verificou efeitos benéficos na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus estressados por superpopulação, havendo aumento significativo destas células em grupos alimentados com 450 mg de vitamina E/kg de ração na dieta.

Esse mesmo autor trabalhando com tilápias alimentadas com dietas suplementadas com vitamina E observou que 500 mg de vitamina E/kg de ração favoreceram significativamente o acúmulo celular, a formação de gigantócitos e de células de Langhans nas lâminas de vidro implantadas no tecido subcutâneo (BELO, 2006). Todavia poucas são as informações a respeito da influência de ácidos graxos essências no acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos na inflamação crônica de peixes.

Assim, com base na importância de estudos de novas funções dos ingredientes comumentes utilizados em rações para peixes, este trabalho se propôs avaliar o efeito da suplementação dietética com ácidos graxos essenciais, em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o desempenho produtivo, hematológico e formação de granulomas por corpo estranho.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Efeitos dos ácidos graxos essenciais em peixes

A principal função dos lipídios utilizados nas dietas de peixes está relacionada ao atendimento da sua demanda energética na forma de ATP proveniente da β oxidação dos ácidos graxos (SARGENT *et al*., 1989; FROYLAND *et al*., 2000). Os lipídios e os ácidos graxos não só atendem as funções energéticas de crescimento e manutenção dos peixes, como também auxiliam nas funções do rim e das brânquias, desenvolvimento neural e visual, reprodução e sanidade desses animais (HENDERSON e TOCHER, 1987; SARGENT *et al*., 1989; TOCHER, 2003). Além disso, os lipídios dietários estão envolvidos no transporte de nutrientes lipossolúveis, tais como esteróides e vitaminas e síntese de hormônios, prostaglandinas e outros componentes metabolicamente ativos. E desempenham papel relevante na manutenção da integridade das membranas celulares sob condições de baixa temperatura e na produção dos eicosanóides. Os ácidos graxos essenciais são sintetizados de forma limitada pelos peixes e devem ser fornecidos na dieta para atender suas exigências nutricionais (MABÍLIA, 2005).

Os lipídios e a composição dos ácidos graxos presentes na dieta podem influenciar na composição dos ácidos graxos na carcaça, na resposta imunológica não específica e, por conseqüência, na resistência às doenças da maioria dos animais, inclusive em peixes (BLAZER, 1992; BALFRY e HIGGS, 2001; GATLIN, 2002). O mecanismo pelo qual os ácidos graxos presentes na dieta de peixes atuam sobre a resposta de defesa tem sido atribuído, em parte, pela influência da produção da prostaglandina e leucotrienos pelos macrófagos. Esses ácidos também atuam sobre a proteína quinase C modificando os sinais de transdução e atuando sobre os receptores de membrana. Outro mecanismo pelos quais os lipídios da dieta atuam sobre a resistência às doenças é por meio da produção de eicosanóides imunologicamente ativos formados a partir do ácido araquidônico monoesterificado (AA), ácido eicosapentanóico (EPA), ácido docosahexanóico (DHA) e possivelmente outro precursor de ácido graxo poliinsaturado, 20:3n-6 (CHANG *et* al.,1992, LIM *et al*., 2005). A própria composição lípidica da membrana

e suas propriedades podem ter efeito sobre a resistência às doenças já que algumas respostas de defesa são baseadas na interação das membranas dos leucócitos, para ativação da produção de citocinas (BALFRY e HIGG, 2001). MILLS *et al*. (2005) relataram que os ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) são reconhecidos como tendo ação antiinflamatória, na qual iniciam e propagam diversos mecanismos envolvendo as células do sistema imunológico. Esses mecanismos estariam relacionados com perfil de eicosanóides, fluidez da membrana, sinal de transdução, expressão do gene e a apresentação do antígeno.

Os eicosanóides derivados a partir do ácido araquidônico (AA) são mais pro inflamatórios que aqueles derivados do EPA e DHA. Além disso, a suplementação dietária com óleo de peixe em estudos com humanos e animais, resultou na diminuição do nível de AA na membrana celular (MAGRUM e JOHNSTON, 1985; CALDER *et al*., 1994) e na capacidade da produção de AA derivados dos eicosanóides, devido à competição inibitória do metabolismo do AA pelos ácidos graxos n-3. (LEE *et al*., 1985; ENDRES, 1989). Como conseqüência há aumento do nível de EPA e subseqüentes efeitos sobre os processos tais como a agregação plaquetária, vasoconstrição, função neutrófila, inflamatória e imunológica (CHAPKIN *et al*, 1990).

A produção dos eicosanóides está associada a situações estressantes e aos processos fisiológicos normais. Os eicosanóides são considerados moduladores da resposta imune e o excesso da produção dos eicosanóides ocorre frequentemente em condições patológicas (SARGENT *et al*., 2002). Os eicosanóides são produzidos a partir do C_{20} PUFA graças à ação da ciclooxigenase e a lipoxigenase resultando em metabólitos que incluem as prostaglandinas, leucotrienos e lipoxis o qual influenciam as funções imunológicas (UHING *et al*., 1990; STANKOVA e ROLA-PLESZCZYNSKI, 1993). As prostaglandinas (PGE_2) derivadas do AA são produzidas pelos monócitos e macrófagos e estão associadas com a modulação da resposta imune celular (KINSELLA e LOKESH, 1990) ao passo que o $PGF_{2\alpha}$ está mais relacionado à adaptação do estresse ambiental (MUSTAFA e SRIVASTAVA, 1989).

VILASECA *et al*. (1990) usaram o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TBSN) no estudo da inflamação com dois grupos de ratos alimentados por quatro semanas com a suplementação dietária enriquecida com o óleo de girassol (n-6) e óleo de fígado de bacalhau (n-3). O nível de eicosanóides luminal aumentou significativamente em ambos os grupos após a administração do TNBS no cólon desses animais. O pico da produção de PGE2 e leucotrienos B_4 (LTB4) ocorreu no terceiro dia e declinou posteriormente, ao passo que o tromboxanos (TXB2) continuou aumentando a partir do terceiro dia no grupo n-6 enquanto que a resposta foi brusca no grupo n-3. Prejuízos macroscópico e histológico da inflamação foram avaliados aos 20, 30 e 50 dias. No grupo n-3 o resultado foi marcadamente reduzido após 30 dias e a inflamação e a ulceração foi quase ausente aos 50 dias. Esses autores concluíram que este fato ocorreu devido ao aumento brusco do TXB2 do grupo tratado com n-3.

ANDOH *et al*. (2003), trabalhando com ratos alimentados com dietas ricas em ácidos graxos n-3 e n-6 por 12 dias antes da indução de uma enterite usando ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS), observaram histologicamente, que a mudança na mucosa foi significativamente mais severa nos ratos que tinham sido alimentados com dietas contendo ácidos graxos n-6 que aqueles alimentados com n-3. O nível de interleucina (IL-6) sérico foi significativamente mais elevado no grupo n-6 que no grupo n-3 sugerindo a supressão da inflamação da mucosa por bloqueio da secreção de IL-6 da mucosa. Interessantemente, não houve diferença nos níveis de TNF-α entre os dois grupos.

Ácidos graxos poliinsaturados n-3 (PUFAs) também inibem a interleucina (IL) - 1β, produção da TNF e a agem como “varredor” de radicais livres e a alteração no tipo e na quantidade de eicosanóides fornecidos na dieta poderia promover a variação dos efeitos dos ácidos graxos n-3 (PUFAs) como por exemplo na produção de citocinas e óxido nítrico (DELUCA *et al*.,1999; DOOPER *et al*., 2003).

Entretanto, vários estudos sobre o efeito dos lipídios e ácidos graxos adicionados à dieta sobre a resposta imunológica e resistência dos peixes têm sido inconsistentes e freqüentemente contraditórios. A deficiência dos ácidos

graxos n-3 tem demonstrado ações adversas sobre a produção de anticorpos e habilidade de fagocitose dos macrófagos em truta arco-íris*, Oncorhynchus mykiss* (KIRON *et al*., 1995) e também o decréscimo da atividade de complemento sérica (TORT *et al*., 1996; MONTEIRO *et al*., 1998).

Algumas evidências na literatura sugerem que mudanças na concentração de n-3 PUFA em dietas para peixes podem ter ação benéfica ou efeito nocivo sobre a resistência a doenças (ERDAL *et al*. 1991; SHELDON e BLAZER, 1991; KIRON *et al*. 1995; MONTERO *et al*., 1999, 2003). O consumo de oxigênio por macrófagos na explosão respiratória da fagocitose em "European seabass" (*Dicentrarchus labrax* L) diminui com o aumento do nível de lipídios na dieta de 90 para 170 g/kg (SITJA-BOBADILLA e PEREZ-SANCHEZ, 1999).

BRANDSEN *et al*. (2003) verificaram aumento na mortalidade acumulada para o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com óleo de girassol e desafiados com a *Vibrio anguillarum*. LI *et al*. (1994) observaram que o bagre do canal (*Ictalurus punctatu*s) alimentados com dietas suplementadas com 2,0% de óleo de savelha apresentaram maior taxa de mortalidade que aqueles alimentados com óleo de vísceras de bagre do canal ou sebo bovino porém não houve diferença significativa para o título de anticorpos após o desafio com a bactéria *Edwardsiella ictaluri*.

THOMPSON *et al*. (1996) observaram que o salmão do Atlântico (*Salmo salar*) alimentado com dietas ricas em ácidos graxos n-3 e n-6 aumentaram a resposta do linfócito B e a taxa de sobrevivência após o desafio com *Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum.* FRACALOSSI e LOVELL (1994b) obtiveram elevados títulos de anticorpos duas semanas após a imunização com *Edwardsiella ictaluri* em bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentados com dietas contendo óleo de savelha se comparada às outras dietas que continham óleo de milho, óleo de linhaça ou a mistura de óleo de savelha, milho e gordura bovina (1:1:1). Uma possibilidade para o efeito dos ácidos graxos na dieta sobre os macrófagos é a alteração no sinal de transdução, que poderia alterar a regulação do gene e a função do macrófago. O papel dos lipídios na imunidade dos peixes pode envolver a modulação da resposta celular por meio de mudanças nas propriedades da

membrana, tais como a permeabilidade e a fluidez, e, portanto as enzimas e receptores associados à membrana (MONTERO *et al*., 2003).

MOURENT *et al*. (2005) observaram diminuição significativa no número de leucócitos circulantes e na atividade respiratória dos macrófagos em "European seabass" (*Dicentrarchus labrax* L.) alimentados com óleo vegetal (linhaça, oliva e girassol) em comparação aos que receberam dieta contendo óleo de peixe. Estes autores não observaram diferença entre a porcentagem de hematócrito, número de eritrócitos circulantes e atividade da lisozima sérica entre os peixes dos diferentes tratamentos.

Resultados semelhantes foram observados por BELL *et al*. (1996) que constataram que salmão do Atlântico alimentado com dietas contendo óleo de linhaça ou girassol não apresentaram diferenças nos efeitos da atividade de lisozima, atividade de complemento ou porcentagem de hematócrito. MONTERO *et al*. (2003) observaram redução na atividade de complemento sérico e atividade fagocítica, porém não alteraram a atividade da lisozima ou do neutrófilo em "gilthead seabream" (*Sparus aurata*) alimentados com dieta contendo óleo de soja (rica em ácido graxo 18:2n-6).

FRACALOSSI e LOVELL (1994b) relataram que em dietas semipurificadas contendo 7% de óleo de savelha (rico em n-3 HUFA) ou óleo de linhaça (rico em 18:3 n-3) promoveram maior susceptibilidade do bagre do canal à bactéria *Edwardsiella ictaluri* quando comparados com os peixes alimentados com óleo de milho ou sebo bovino ou a mistura das três fontes de lipídeos, a 28^{o}C. Entretanto não houve diferença significativa na taxa de mortalidade quando os peixes foram mantidos a 17 ^{o}C. Esses autores alegaram que em condições de baixa temperatura o bagre do canal metaboliza os ácidos graxos n-3 e n-6 para os eicosanóides imunoregulatórios similarmente aos animais de sangue quente. Assim a redução da resistência à *E. ictaluri* associada à alimentação com óleo de savelha ou linhaça poderia ser explicada pela diminuição da síntese de leucotrienos pela competição inibitória do metabolismo do AA pelo ácido graxo n-3 a partir do óleo de linhaça e savelha.

ERDAL *et al*. (1991) observaram que o salmão do Atlântico alimentado com dietas ricas em n-3 HUFA obteve diminuição do título de anticorpos após a vacinação e redução na taxa de sobrevivência após o desafio com *Vibrio salmonicida*. BRANSDEN *et al*. (2003) observaram aumento significativo na mortalidade acumulada em salmão do Atlântico alimentado com dietas contendo óleo de girassol e desafiados com *Vibrio anguillarum*. Doses excessivas de n-3 HUFA induzem aumento na taxa de mortalidade de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (KIRON *et al*., 1995).

LEITCH *et al*. (1984) e LEE *et al*. (1985) demonstraram que o efeito negativo da dieta contendo HUFA n-3 sobre a resposta imune foi causado pela diminuição da produção de leucotrieno B_4 e o aumento dos leucotrienos B_5 pelos macrófagos e neutrófilos. Leucotrieno B_4 é um eicosanóide que tem efeito imunoestimulatório na qual incluem a proliferação de linfócitos e ação quimiotáxica e quimiocinética do leucócito, enquanto que o leucotrieno B_5 é outro eicosanóide com ação imunossupressora (GOLDMAN *et al*., 1983). Leucotrieno B_4 é produzido principalmente a partir do ácido graxo 20:4n-6, enquanto que leucotrieno B_5 é derivado principalmente a partir do ácido graxo 20:5n-3. A redução da resistência imunológica dos peixes alimentados com dietas ricas com ácidos graxos poliinsaturados n-3 pode ser causada, em parte pela competição inibitória do metabolismo do AA pelos ácidos graxos n-3. Há competição inibitória entre os ácidos graxos da família n-6, n-3 e n-9 por desnaturases responsável pela a síntese dos ácidos graxos poliinsaturados (GOLDMAN *et al*., 1983; KRAGBALLE *et al*., 1987; HWANG, 1989, SECOMBES *et al*., 1994).

O metabolismo do ácido araquidônico (AA) em animais de sangue quente, resulta na formação de eicosanóides. Contudo o aumento de ácidos graxos n-3 na dieta resulta na redução da disponibilidade de AA, por inibição de sua síntese a partir do ácido linoléico, e o aumento do EPA (JOHNSTON, 1985; HWANG, 1989; KINSELLA e LOKESH, 1990). Com a estimulação antigênica, AA e EPA são liberados a partir da posição sn-2 da membrana dos fosfolipídeos das células imunocompetentes, tais como os macrófagos, para formar tipos distintos de eicosanóides (KINSELLA e LOKESH, 1990).

Todavia os ácidos graxos dietários também tem efeitos benéficos diretos e indiretos sobre a reposta imune (PABLO *et al*., 2002), na produção das citocinas (ENDREAS *et al*., 1989; YAQOOB e CALDER, 1995) ou na proliferação dos linfócitos (ENDREAS *et al*, 1989; MEYDANI *et al*., 1991; SECOMBES *et al*., 1985; YAQOOB *et al*., 1994).

SHELDON e BLAZER (1991) encontraram aumento da atividade bactericida dos macrófagos em bagre do canal alimentados com óleo de savelha quando comparados a peixes alimentados com óleo de soja, milho ou sebo bovino.

Aumento da atividade dos macrófagos renais pode estar associado com o aumento de ácidos graxos n-3 em bagre do canal (BLAZER, 1992) e truta arco-íris (ASHTON *et al*., 1994). Além disso, o salmão do Atlântico alimentado com dietas contendo altos níveis de n-3/ n-6 PUFA tem aumentado à resposta do linfócito B quando desafiados com *Aeromonas salmonicida* e *V. anguillarum* (THOMPSON *et al*, 1996).

2.1 Gigantócitos e Granulomas em Peixes

O processo inflamatório é um fenômeno que tem como objetivo diluir, destruir e circunscrever agentes patógenos invasores como forma de defesa do organismo (GARCIA - LEME, 1989). Em granulomas tipo corpo estranho formam-se macrófagos policariontes pela fusão da membrana celular de macrófagos (GILLMAN e WRIGHT, 1966; MARIANO e SPECTOR, 1974). O mesmo ocorre na superfície de lamínulas de vidro quatro dias após seu implante no tecido subcutâneo de camundongos (RYAN e SPECTOR, 1970). Graças ao recrutamento de novos macrófagos, entre sete a dez dias as células gigantes tipo corpo estranho, em que os núcleos estão dispostos aleatoriamente no citoplasma, evoluem para células do tipo Langhans, cujos núcleos deslocam-se para a periferia da célula, conferindo o aspecto de "coroa" (MARIANO e SPECTOR, 1974).

Estudos *in vitro*, MCNALLY e ANDERSON (1995) demonstraram a formação de células gigantes pela fusão de macrófagos derivados de monócitos humanos após a indução com as interleucinas 3 e 4. No ano seguinte esses mesmos autores (MCNALLY e ANDERSON, 1996), observaram que a fusão dos macrófagos necessita de receptores de manose que são altamente estimuladas pelas interleucinas 4. Estes autores observaram a participação do retículo endoplasmático dos macrófagos durante o processo de fusão celular, após a aproximação destas estruturas aos receptores de manose. Tal mecanismo de acoplamento apresenta características semelhantes às observadas no processo de fagocitose (MCNALLY e ANDERSON, 2005). MCNALLY e ANDERSON (2003) observaram que a formação de células gigantes tipo corpo estranho *in vitro* foi potencializada com a inclusão da vitamina E quando utilizaram monócitos de seres humanos.

A taxa de migração de macrófagos para a lamínula de vidro implantada depende da natureza da reação inflamatória e do tecido conectivo que a envolve. Conforme demonstrado por BIRMAN e MARIANO (1985), a inoculação de BCG vivo no local do implante da lamínula causa drástica redução na formação de

células gigantes, redução do número de núcleos/célula gigante e bloqueio na transformação de célula tipo corpo estranho para célula tipo Langhans. Este fenômeno pode ser explicado pela indução do processo inflamatório provocado pelo BCG vivo ser de alta renovação. O contrário ocorre com a inoculação de carragenina, pois esta substância induz a formação de granuloma de baixa renovação. Em frangos, GRECCHI *et al*. (1980) observaram que a formação das células gigantes em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo ocorreu precocemente, a partir de 12 horas, sendo que a partir das 18 horas esta reposta tornou-se mais intensa.

A ocorrência da formação de células gigantes em processos inflamatórios crônicos em peixes é descrita em diversas enfermidades infecto-contagiosas, tais como a causada pela *Edwardsiella tarda* em tilápia nilótica (MIYAZAKI e KAIGE, 1985), *Ichthyophonus hoferi* em *Pleuronectes platessa* (TIMUR e TIMUR, 1984) e *Mycrosporidium* sp. na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (PUSLFORD e MATHEUS, 1991).

PEINGNOU-DEVILLE *et al*. (1989) demonstraram a presença de células gigantes circundando a área de implante de tecido ósseo desmineralizado pela bactéria *Aeromonas anguilla* em tecido muscular de *Scyliorhinus canicula* dois meses e meio após o implante. Vários autores estudaram, *in vitro*, a formação de células gigantes em culturas de macrófagos, obtidos do rim cefálico de diferentes espécies de peixes (COUSO *et al*., 2002). A análise comparativa entre os resultados observados no processo evolutivo de diferenciação e fusão dos macrófagos verificou-se que o início da formação de células gigantes com 24 horas em *Sparus aurata* (COUSO *et al*., 2002), em dois a três dias em *Cyprinus carpio* (BAYNE, 1986) e depois de uma semana em *Oncorhynchus mykiss* (SECOMBES, 1985).

Examinando lesões provocadas pela larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* em trutas *Oncorhynchus mykiss* infestadas experimentalmente e em *Gadus morhua* infectados naturalmente, RAMAKRISHNA e BURT (1991) descreveram inflamações granulomatosas com presença de células gigantes somente em trutas. Células gigantes tipo corpo estranho e tipo

Langhans surgiram 32 dias pós-infecção, adjacentes ao parasito, logo acima da camada de células epitelióides, muitas das quais apresentavam dois ou mais núcleos.

MATUSHIMA (1994) detectou a presença de poucas células gigantes tipo corpo estranho três dias após a inoculação do BCG, que apareceram com maior freqüência aos sete dias quando avaliou o processo inflamatório crônico induzido pela inoculação intramuscular de BCG em tilápias do Nilo. Após 21 dias, estas já possuíam maior organização e, aos 33 dias células gigantes do tipo corpo estranho já podiam ser encontradas englobando grumos de BCG. Estas células também podiam ser encontradas em locais mais distantes formando “ninhos” de células inflamatórias junto com linfócitos, fibroblastos e macrófagos.

KOPPANG *et al*. (2005) observaram lesões com severa mineralização da musculatura da cavidade abdominal e, por conseguinte alterações na pigmentação dos filés de salmão do Atlântico, provavelmente devido às conseqüências de respostas vacinais seguidas por reações inflamatórias comprovadas por análises histológicas pela presença de macrófagos, células epitelióides, gigantócitos e melanomacrófagos.

Estudando a cinética de macrófagos policariontes, PETRIC *et al*. (2003 a, b) demonstraram que houve formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo após três dias em pacus jovens e que esse fenômeno aumentou com o tempo. A suplementação da dieta de pacus com 100, 200 ou 500 mg de vitamina C/kg de ração induziram aumento no número de macrófagos policariontes e número de núcleos/gigantócito formado, além de acelerar a transformação de células do tipo corpo estranho em células de Langhans. Efeito semelhante foi observado por BRUM (2003) que constatou que a suplementação dietária com vitamina C na dose de 500 mg/kg favoreceu o maior recrutamento de macrófagos policariontes em função do tempo (aos três dias) se comparado àqueles que receberam a dieta controle (ausência de vitamina C). Esse efeito foi observado também em peixes mantidos em alta densidade, graças aos menores níveis de cortisol plasmático, em relação aos mantidos no mesmo sistema e não suplementados.

BELO *et al*. (2005) verificaram efeitos benéficos na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus estressados mantidos em alta densidade de estocagem, havendo aumento significativo destes em grupos alimentados com dietas suplementadas com 450 mg de vitamina E/kg de ração.

A suplementação alimentar com vitamina E (500 mg/kg de ração) em dietas para tilápia do Nilo favoreceu significativamente o acúmulo celular, a formação de gigantócitos e de células de Langhans nas lâminas de vidro implantadas no tecido subcutâneo desses animais submetidos à alta densidade (20 kg/m^3), à vacina e ao desafio com a bactéria *Mycobacterium marinum* (BELO, 2006).

3. OBJETIVOS

A proposta deste trabalho foi estudar o efeito da suplementação dietética com ácidos graxos essenciais sobre o desempenho produtivo, perfil hematológico e a inflamação crônica por corpo estranho em juvenis de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Unesp – Universidade Estadual Paulista, Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos (Lapoa) do Centro de Aqüicultura (Caunesp) e no Laboratório de Ictiopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo.

4.1 Peixes e acondicionamento

Foram utilizadas 300 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) jovens, com peso médio de 69,86 ± 5,01 gramas, acondicionadas em 20 caixas de fibra de vidro (15 peixes/caixa), com capacidade de 310 litros cada, pertencentes ao Laboratório de Patologia de Organismos Aquáticos do Caunesp, Câmpus de Jaboticabal (Figura 1). As caixas experimentais foram abastecidas com água corrente desprovida de cloro, proveniente de poço artesiano com vazão de 1 L/min e aeração suplementar.

Para minimizar os efeitos do estresse de captura, transporte e manejo dos peixes, os mesmos passaram por tratamento profilático em solução de NaCl na proporção de 6g/L de água, durante 15 minutos, três dias consecutivos (CARNEIRO e URBINATI, 2001).

Após o término do período de aclimatação (15 dias), os juvenis passaram a receber as dietas experimentais contendo os ácidos graxos essenciais durante 90 dias para avaliação do desempenho produtivo. Para o estudo da cinética do processo inflamatório, os peixes continuaram a serem alimentados com as dietas experimentais e aos 120 dias foram submetidos à implantação da lamínula de vidro no tecido subcutâneo e avaliados os mecanismos de defesa desses animais por meio do acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos, além do estudo das variáveis eritrocitárias. O estudo da cinética dos macrófagos ocorreu após um mês ao término da avaliação do desempenho produtivo para que pudesse ser minimizado o estresse desses animais o qual poderia interferir nos resultados do

estudo hematológico e no recrutamento dos macrófagos e a formação das células gigantes em resposta ao corpo estranho.

Figura 1 – Caixas experimentais do LAPOA/ CAUNESP

4.2 Delineamento experimental

Foram utilizadas duas fontes de ácidos graxos essenciais: óleo de soja degomado (OS) e óleo de linhaça (OL) nas proporções de 100,0% OS; 75,0% OS + 25,0% OL; 50,0% OS + 50,0% OL; 25,0% OS + 75,0% OL e 100,0% OL, sendo que cada tratamento possuía quatro repetições (Tabela 1). O fornecimento das dietas experimentais com ácidos graxos essenciais foi iniciado 120 dias antes do implante das lamínulas de vidro.

Tabela 1 - Distribuição dos peixes nos diferentes grupos experimentais.

Grupo experimental (Número de peixes)	Sacrifício pós-implante			
	2 dias	4 dias	6 dias	8 dias
100% de óleo de soja e 0% de óleo de linhaça (n=60)	***n=10***	***n=10***	***n=10***	***n=10***
75% de óleo de soja e 25% de óleo de linhaça (n=60)	***n=10***	***n=10***	***n=10***	***n=10***
50% de óleo de soja e 50% de óleo de linhaça (n=60)	***n=10***	***n=10***	***n=10***	***n=10***
25% de óleo de soja e 75% de óleo de linhaça (n=60)	***n=10***	***n=10***	***n=10***	***n=10***
0% de óleo de soja e 100% de óleo de linhaça (n=60)	***n=10***	***n=10***	***n=10***	***n=10***

4.3 Balanceamento da ração e suplementação com ácidos graxos essenciais

Para estudar o efeito dos ácidos graxos na ração, foi formulada uma dieta prática (basal) com 28,0% PD e 3200 Kcal de ED/kg de ração e utilização de dois tipos de óleos: óleo de soja degomado (como fonte de ácido graxo ômega 6) e óleo de linhaça (como fonte de ácidos graxos ômega 3).

A dieta basal foi formulada no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos - AquaNutri da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Câmpus de Botucatu. A composição da dieta basal seguiu às exigências para tilápias em crescimento, estabelecida no NRC (1993).

Com a formulação da dieta básica foram confeccionadas as dietas experimentais com dois tipos de óleos (óleo de soja degomado - OS e óleo de linhaça - OL) em diferentes proporções na ração conforme exposto no delineamento experimental. As rações peletizadas foram confeccionadas na fábrica de ração da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, sendo posteriormente estocada em saco plástico escuro, a - 10^{o}C.

Após a confecção das dietas experimentais, as rações foram encaminhadas para serem analisadas. A análise da composição químico-bromatológica das rações foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal e Pastagem do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Câmpus de Jaboticabal.

A composição percentual e a análise químico-bromatológica da dieta basal está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição percentual e análise químico-bromatológica da dieta

Ingrediente	Porcentagem (%)
Farelo de soja	33,00
Fubá de milho	18,00
Farelo de trigo	15,00
Farelo de arroz	9,00
Farinha de peixe	16,50
Óleo[1]	6,00
Fosfato bicálcico	1,00
Suplemento vitamínico e mineral	0,50
BHT (antioxidante)	0,02
Calcário calcítico	0,98
Total	100,00
Proteína bruta (%)[2]	29,15
Energia bruta (kcal)[2]	3076,87
Fibra bruta (%)[2]	4,72
Extrato etéreo (%)[2]	10,44
Extrato não nitrogenado (%)[2]	37,10
Matéria seca (%)[2]	90,73

[1] As proporções de óleo de soja degomado e óleo de linhaça serão adicionados de acordo com cada tratamento
[2] Analisado

4.4. Perfil dos ácidos graxos essenciais

Após a confecção das dietas, amostras das rações foram encaminhadas para o Laboratório de Bioquímica de Microorganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Estado de São Paulo, para análise do perfil ácidos graxos essenciais, utilizando o cromatógrafo a gás GC – 14B – Shimadzu.

4.5. Manejo dos peixes

Os peixes foram pesados e medidos no início do experimento, com o auxílio de balança eletrônica com capacidade de um quilograma e ictiômetro respectivamente, sendo os mesmos anestesiados em banho com solução de benzocaína (1g/10L) até a perda de equilíbrio para facilitar o manejo e evitar possíveis danos físicos as tilápias. Após a biometria inicial os peixes passaram por período de aclimatação de 15 dias antes do início do ensaio oferecendo-se nesta fase as rações experimentais para todos os animais.

Durante o período experimental, a alimentação foi fornecida diariamente, duas vezes ao dia (pela manhã e à tarde), nos horários de 8h00 e 14h00, correspondendo cerca de 3,0% da biomassa por dia. Para evitar o acúmulo de sobras de ração e matéria orgânica nas caixas foi realizada a sifonagem em dias alternados. As rações experimentais foram pesadas rotineiramente para avaliação da quantidade de ração ministrada aos peixes.

4.6. Monitoramento da qualidade da água

O monitoramento da qualidade da água foi realizado diariamente às 8h00 e 14h00, avaliando-se a temperatura da água, a concentração de oxigênio dissolvido, o potencial hidrogeniônico (pH) e condutividade elétrica. Além disso, amostras de água obtidas no período da manhã antes do fornecimento da ração foram coletadas quinzenalmente para a realização das análises de alcalinidade, clorofila e amônia no Laboratório de Qualidade de Água no Centro de Aqüicultura, Câmpus de Jaboticabal.

4.7. Desempenho zootécnico

Para a análise de desempenho produtivo foram realizadas biometrias mensais até completar 90 dias de período experimental. Em cada biometria os peixes foram anestesiados em banho de benzocaína (1g/10 L de água) até a

perda do equilíbrio. Todos os peixes de cada tratamento foram pesados e medidos para avaliação dos seguintes parâmetros:

- Consumo de ração (CR);

- Ganho de peso (GP)
  [GP = peso final - peso inicial];

- Conversão alimentar aparente (CA)
  [CA = consumo de ração/ ganho de peso];

- Taxa de crescimento específico (TCE)
  [TCE= 100x (ln peso final – ln peso inicial/ dias de experimento)]

4.8. Procedimento cirúrgico da implantação da lamínula

4.8.1. Anestesia dos peixes

Os peixes foram pré-anestesiados com solução de benzocaína (1:20.000) na própria caixa após diminuição do nível da água e mantidas até o momento do processo cirúrgico. Em seguida, os peixes foram anestesiados individualmente no momento do implante da lamínula, utilizando-se solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:10.000. Inicialmente a benzocaína foi diluída em álcool 98^{o} (0,1 g/mL), completando-se o volume para 1L (WEDEMEYER, 1970; MATUSHIMA e MARIANO, 1996).

4.8.2. Implante da lamínula

Decorrido os 120 dias de experimento, os peixes foram submetidos ao implante da lamínula de vidro (lamínula arredondada de 9 mm, marca Knittel®) no tecido subcutâneo da região latero-dorsal (Figura 2), atrás do opérculo. Inicialmente, os peixes foram anestesiados em solução aquosa de benzocaína e a verificação do estado anestésico, após sua permanência por dois a três minutos na mesma, foi obtido por meio da imobilidade do peixe no fundo da caixa (MATUSHIMA e MARIANO, 1996). O implante da lamínula seguiu as determinações descritas por PETRIC *et al*. (2003) e BELO (2006). Com o auxílio de bisturi foi realizada uma pequena incisão na região latero-dorsal esquerda das tilápias sendo o tecido subcutâneo imediatamente divulsionado com tesoura cirúrgica e a lamínula esterilizada foi implantada entre a pele e tecido muscular subjacente (Figura 3 e 4). A seguir, a pele foi suturada (Figura 5) com pontos simples usando-se fio de náilon previamente esterilizado. Assim, cada peixe teve uma lamínula implantada atrás do opérculo esquerdo na altura do início da nadadeira dorsal (Figura 6). Após o manuseio cirúrgico experimental, os animais foram novamente colocados nas caixas com fluxo contínuo de água e aeração suplementar. Para a prevenção de infecção por agentes oportunistas, foi feito banho de sal (10g/L), durante 15 minutos, repetindo este procedimento nos dois dias seguintes (banho de sal 1g/L). O implante das lamínulas nos peixes foi aleatório, mantendo a amostragem de dez peixes por tratamento e período.

4.8.3. Sacrifício, colheita, fixação e coloração das lamínulas

Para a retirada das lamínulas implantadas, os peixes foram sacrificados utilizando solução aquosa de benzocaína na proporção de 1:500 aos dois, quatro, seis e oito dias após o implante das lamínulas. Após a abertura do ponto cirúrgico, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas com o auxílio de uma pinça, lavadas com solução salina 0,65% para retirada de fibrina e outras células aderentes à lamínula que não macrófagos e células gigantes para serem fixadas em solução

de Bouin por cerca de um minuto e coradas com hematoxilina-eosina posteriomente.

Para a avaliação da resposta inflamatória, todas as dez lamínulas por caixa foram analisadas sendo selecionada a sete melhores quanto à sua integridade e coloração para o estudo da cinética dos macrófagos policariontes sendo que cada uma foi considerada uma unidade experimental. Os macrófagos policariontes formados foram contados "*in totum*", assim como, o número de núcleos por célula gigante, o número de gigantócitos do tipo corpo estranho e do tipo Langhans para estabelecer a correlação entre eles. Estas contagens foram realizadas em microscópio de luz em aumento de 400 vezes, sendo realizada a contagem de cinco campos por animal, totalizando 35 campos por tratamento.

Procedimento cirúrgico do implante da lamínula no tecido subcutâneo da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Figura 2 – Incisão dorso lateral esquerda da tilápia

Figura 3 – Divulsiomento do tecido do subcutâneo

Figura 4 - Implante da lamínula

Figura 5 - Sutura da ferida cirúrgica após o implante da lamínula

Figura 6 - Tilápia com lamínula implantada no tecido do subcutâneo

4.9. Parâmetros hematológicos

Para as avaliações hematológicas foram colhidas amostras de sangue através de punção da veia caudal de 10 peixes por tratamento e período, aos 90 dias de experimento (dia 0) e após o processo cirúrgico, no segundo, quarto, sexto e oitavo dia antes do procedimento de retirada das lamínulas, para imediata determinação do número de eritrócitos, porcentagem de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hb) e volume corpuscular médio por meio do contador automático de células sanguíneas (Modelo CC510, Celm).

4.10. Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos nesse experimento foi realizada utilizando-se o programa estatístico Sisvar. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para os valores de F que indicaram diferença significativa ($P<0,01$). Para a comparação de média pelo teste de Tukey foi utilizado o nível de 5,0% de probabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÂO

5.1. Perfil de ácidos graxos nas dietas experimentais

O resultado obtido da análise cromatográfica do conteúdo de ácidos graxos presentes nas dietas experimentais está expressa na Tabela 3

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais obtidas por meio da análise cromatográfica.

	Tratamentos[1]				
	100%OS	75%OS+ 25% OL	50%OS+ 50%OL	25%OS+ 75%OL	100%OL
C14:0 (Ác. Mirístico)	0,59	0,47	0,49	0,93	0,87
C16:0 (Ác. Palmítico)	14,15	15,28	15,74	17,32	18,38
C16:1 (Ác. Palmitoleico)	1,12	1,29	1,88	2,95	3,74
C17:0 (Ác. Heptadenóico)	0,18	0,14	0,14	0,2	0,19
C18:0 (Ác. Esteárico)	3,17	3,14	3,52	3,63	4,1
C18:1n9c (Ác. Oléico)	24,14	25,35	27,53	29,1	31,21
C18:2n6c (Ác. a - Linoleico)	47,65	37,3	21,36	12,64	3,92
C18:3n3 (Ác. Linolênico)	5,18	14,24	26,4	28,79	33,67
C20:1n9c (Ác. Eicosenóico)	0,34	0,28	0,3	0,36	0,34
C20:5n3 (Ác. Eicosapentaenóico)	0,56	0,19	0,2	0,67	0,45
C22:6n3 (Ác. Docosahexaenóico)	0,81	0,29	0,32	1,01	0,69
NI - Não identificados	2,11	2,03	2,12	2,4	2,44
Total	100	100	100	100	100

[1] ***OS - óleo de soja degomado e OL - óleo de linhaça***

De acordo com o estabelecido no delineamento experimental e a utilização do óleo de soja degomado e óleo de linhaça, ricos em ácido linoleico (C18:2n6c) e linolênico (C18:3n3), respectivamente, pode-se constatar pelo resultado da análise cromatográfica que o perfil de ácidos graxos das dietas experimentais mantiveram a relação plausível com o objetivo do estudo proposto.

Em sistemas de produção intensiva a boa nutrição desempenha papel fundamental na promoção do crescimento e manutenção da saúde dos peixes. Nutrientes adequados devem ser adicionados às dietas para reduzir os efeitos

nocivos do estresse, preservando assim a saúde e o bem estar dos animais (GATLIN e PENGLI, 2005).

Dentre as principais funções dos lipídios das dietas para peixes pode-se destacar atendimento da demanda energética na forma de ATP, função carreadora de vitaminas lipossolúveis, favorecimento do “flavor” e da textura da ração, precursor de formação de fosfolipídeos, que são componentes da membrana celular e organelas além de fontes de ácidos graxos essenciais dentre outras funções.

Além de atender as exigências nutricionais dos peixes, ambas as séries de ácidos graxos essenciais (n-3 e n-6) produzem quatro séries de eicosanóides fisiologicamente ativos como prostaglandinas, prostaciclinas, tromboxanos e leucotrienos, envolvidos na contração da musculatura de alguns órgãos, coagulação sanguínea e processos imunológicos e inflamatórios (LOGATO, 2000).

Geralmente, os eicosanóides originários do ácido aracdônico (n-6) possuem funções antagônicas aos eicosanóides originados do n-3. Outra função importante dos ácidos graxos poliinsaturados é a sua participação na formação dos fosfolipídeos da membrana celular, que são responsáveis pela manutenção da integridade, fluidez e permeabilidade da célula (LOGATO, 2000). A fluidez da membrana depende do balanço adequado de ácidos graxos essenciais saturados e insaturados que compõem os fosfolipídeos presentes. O papel dos ácidos graxos da família n-3 é manter a fluidez da membrana fosfolipídica principalmente a baixa temperatura. Os peixes alteram a composição dos fosfolipídeos das membranas em resposta às mudanças de temperatura do ambiente (FRACALOSSI e LOVELL, 1995; WEBSTER et al., 1994)

Segundo NEW (1987), a exemplo dos mamíferos, os peixes não conseguem sintetizar ácidos graxos das famílias linolênica (série n-3) e linoleica (série n-6) e, portanto devem ser supridos na dieta para obter o crescimento satisfatório e manutenção do bom estado de saúde.

De forma geral, observa-se que as exigências nutricionais em ácidos graxos essenciais variam entre outras causas, com a espécie e o tamanho dos peixes, com a temperatura da água, e com as fontes de alimento natural presentes no ambiente. Em geral, peixes de água doce necessitam tanto do ácido linoleico (n-6) como o ácido linolênico (n-3) (PEZZATO et al., 2004).

A exigência de ácidos graxos essenciais nos peixes diferencia-se consideravelmente entre as espécies (NRC, 1993). Espécies de águas quentes têm exigência específica menor para os ácidos graxos da série n-3 que as de água fria. A deficiência de ácidos graxos poliinsaturados n-3 causa redução no crescimento, despigmentação, erosão das nadadeiras, síndrome do choque e acúmulo de gordura. De acordo com o NRC (1993), a exigência de ácidos graxos essenciais para tilápia do Nilo é de 0,5% de 18:2, n-6.

*O bagre do canal, o salmão "coho" (*Oncorhychus kisutch*)* e a truta arco-íris *(*Oncorhynchus mykiss*)* exigem ácidos graxos da série n-3 linolênico (18:3), eicosapentenóico (20:5), ou docohexenóico (22:6). Já a tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) e a carpa comum *(*Cyprinus carpio*)* necessitam quantidades iguais de ácidos graxos de tipo 18:2 e 18:3 (PEZZATO et al., 2004) enquanto para a tilápia híbrida CHOU e SHIAU (1999) reportaram que os ácidos graxos da família n-3 e n-6 são essenciais para o seu máximo crescimento.

A carpa comum requer uma mistura dos ácidos graxos poliinsaturados n-3 e n-6 (TAKEUCHI e WATANABE, 1977) enquanto que para a tilápia, KANAZAWA et al. (1980) e TAKEUCHI et al., (1983) apenas os ácidos graxos n-6 são exigidos.

5.2. Monitoramento de qualidade da água

A tabela 4 apresenta os valores médios com seu respectivo desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água (temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica, alcalinidade, clorofila e amônia) mensurados durante todo período experimental. Os valores dos parâmetros físico-químicos da água avaliados permaneceram praticamente constantes durante o todo experimento, sendo que os valores médios de temperatura (28,17 ± 1,0), oxigênio dissolvido (5,15 ± 0,4), pH (7,45 ± 0,06), condutividade elétrica (178,5 ± 5,3), alcalinidade (190,9 ± 2,66), clorofila (1,14 ± 2,11) e amônia (197,61 ± 94,75) encontram dentro da faixa de conforto para essa espécie em questão (CASTAGNOLLI e CYRINO, 1986 e KUBITZA, 2000). Assim a qualidade da água permaneceu dentro dos padrões observados por SIBAÚBA-TAVARES (1995).

De acordo com EL-SAYED e KAWANNA (2004), as tilápias toleram amplas variações de temperatura, oxigênio dissolvido, salinidade, potencial hidrogeniônico (pH) e fotoperíodo. Entretanto, a manutenção de condições ambientais dentro da faixa de conforto para essa espécie é fundamental para sucesso da tilapicultura intensiva (MUIR et al., 2000).

Desta forma pode-se inferir que os parâmetros de qualidade de água tiveram pouca influência sobre os resultados obtidos de desempenho produtivo, hematológicos e da resposta inflamatória granulomatosa dos peixes suplementados com ácidos graxos essenciais na dieta já que os parâmetros de qualidade de água mantiveram dentro da faixa de conforto para o tilápia do Nilo durante o experimento.

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos parâmetros da qualidade da água dos aquários avaliados durante o período experimental.

	Temperatura (C^o)	**O_2D (mg/L)**	**pH**	**Condutividade elétrica (µS/cm)**	**Alcalinidade (mg/L)**	**Clorofila (µ/L)**	**Amônia (µg/L)**
1º Mês	28,28 ± 1,1	5,12 ± 0,3	7,47 ± 0,1	178,1 ± 2,7	184,8 ± 3,03	2,23 ± 2,82	246,97 ± 87,63
2º Mês	26,93 ± 0,8	5,42 ± 0,4	7,43 ± 0,1	176,5 ± 3,2	193,2 ± 3,48	0,78 ± 1,34	170,24 ± 71,99
3º Mês	28,12 ± 1,0	5,19 ± 0,3	7,52 ± 0,05	178,6 ± 6,6	192,0 ± 2,48	0,33 ± 1,51	162,10 ± 77,43
4º Mês	28,06 ± 1,1	5,18 ± 0,4	7,48 ± 0,1	179,2 ± 5,9	193,6 ± 1,67	1,23 ± 2,77	211,12 ± 141,95
Média	28,17 ± 1,0	5,15 ± 0,4	7,45 ± 0,06	178,5 ± 5,3	190,9 ± 2,66	1,14 ± 2,11	197,61 ± 94,75

5. 3. Parâmetros de desempenho produtivo

Os resultados dos parâmetros zootécnicos avaliados [ganho de peso (GP); consumo, conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE)], referente aos 90 dias de experimento são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios[1], erro padrão e o resultado da análise de variância[2] do ganho de peso (GP), consumo de ração (kg), conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções.

Tratamentos		Parâmetros de desempenho produtivo			
		GP (g)	Consumo (kg)	CA	TCE
1º Mês	**100% OS**	46,61±5,81^{Ab}	0,66±0,07^{Aab}	1,50±0,22^{Aa}	464,89±6,02^{Aa}
	75%OS+25%OL	46,16±5,81^{Aa}	0,59±0,07^{Aab}	1,27±0,22^{Aa}	462,60±6,02^{Aa}
	50%OS+50%OL	45,32±5,81^{Aa}	0,60±0,07^{Aa}	1,31±0,22^{Aa}	460,17±6,02^{Aa}
	25%OS+75%OL	45,09±5,81^{Ab}	0,70±0,07^{Aab}	1,63±0,22^{Aa}	471,70±6,02^{Aa}
	100% OL	40,88±5,81^{Aa}	0,59±0,07^{Aa}	1,46±0,22^{Aa}	468,34±6,02^{Aa}
Valor de F		0,154	0,446	0,456	0,578
Pr > F[3]		0,9599	0,7743	0,7671	0,6813
2º Mês	**100% OS**	40,69±5,81^{Aab}	0,81±0,07^{Ab}	2,00±0,22^{Aa}	491,85±6,02^{Ab}
	75%OS+25%OL	38,71±5,81^{Aa}	0,80±0,07^{Ab}	2,09±0,22^{Ab}	488,87±6,02^{Ab}
	50%OS+50%OL	39,37±5,81^{Aa}	0,85±0,07^{Ab}	2,14±0,22^{Ab}	487,40±6,02^{Ab}
	25%OS+75%OL	48,05±5,81^{Ab}	0,88±0,07^{Ab}	2,10±0,22^{Aa}	500,70±6,02^{Ab}
	100% OL	37,97±5,81^{Aa}	0,86±0,07^{Ab}	2,27±0,22^{Ab}	492,64±6,02^{Ab}
Valor de F		0,495	0,193	0,208	0,736
Pr > F[3]		0,7393	0,9404	0,9327	0,5774
3º Mês	**100% OS**	26,71±5,81^{Aa}	0,50±0,07^{Aa}	1,92±0,22^{Aa}	488,67±6,02^{Ab}
	75%OS+25%OL	27,83±5,81^{Aa}	0,45±0,07^{Aa}	1,67±0,22^{Aab}	480,21±6,02^{Ab}
	50%OS+50%OL	28,34±5,81^{Aa}	0,52±0,07^{Aa}	1,88±0,22^{Aab}	492,37±6,02^{Ab}
	25%OS+75%OL	25,83±5,81^{Aa}	0,56±0,07^{Aa}	2,10±0,22^{Aa}	503,65±6,02^{Ab}
	100% OL	24,48±5,81^{Aa}	0,41±0,07^{Aa}	2,01±0,22^{Aab}	496,32±6,02^{Ab}
Valor de F		0,071	0,602	0,578	2,100
Pr > F[3]		0,9904	0,6630	0,6797	0,1179

(1) Média aritmética de 300 tilápias por mês (5 tratamentos x 60 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Pr>F - Probabilidade de significância de F

Quanto aos parâmetros de desempenho produtivo pode-se observar que não houve diferença significativa (P>0,05) quanto ao ganho de peso (GP), consumo de ração, conversão alimentar aparente (CA) e taxa de crescimento específico (TCE) entre as dietas experimentais os quais os peixes foram submetidos durante os 90 dias de experimento.

Estes resultados estão em concordância com os encontrados por HANLEY (1991) que não observou diferença no ganho de peso e conversão alimentar de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de lipídios (sebo bovino) nas dietas (5,0, 9,0 e 12,0%). LI *et al*. (1994) também não observaram diferença significativa para ganho de peso, conversão alimentar aparente, taxa de sobrevivência do bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) alimentado com dietas suplementadas com 2,0% de óleo de vísceras de bagre do canal, sebo bovino e óleo de savelha.

MOURENT *et al*. (2005) trabalharam com a substituição parcial do óleo de peixes pelo óleo de colza, linhaça e oliva em dietas para ”European seabass” (*Dicentrarchus labrax* L.) e não observaram diferença significativa entre os tratamentos para ganho de peso, comprimento, consumo de ração e taxa de crescimento específico. Resultados similares foram encontrados previamente em outros estudos com salmonídeos onde o óleo vegetal e marinho foram utilizados na formulação de dietas (DOSANIJH *et al*., 1988; POLVI e ACKMAN, 1992; GUILLOU *et al*. 1995; TOCHER *et al*., 2000) ou em estudos utilizando altos níveis de energia/lipídios na formulação das dietas (TORSTENSEN *et al*., 2000; BELL *et al*., 2001, 2002, 2003).

SUBHADRA *et al*. (2006) não observaram diferença no ganho de peso, taxa de sobrevivência, conversão alimentar aparente e taxa de eficiência protéica em “largemouth bass” (*Micropterus salmoides*) em dietas suplementadas com 10% de óleo de canola, gordura de frango, óleo de savelha ou mistura de gordura de frango:óleo de savelha (50:50).

Em contrapartida, NG et al. (2006) estudando a substituição do óleo de peixe por óleo de palma em dietas para tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), observaram melhora significativa no ganho de peso e na taxa de crescimento

específico e conversão alimentar dos peixes alimentados com 100 g de óleo de palma/kg.

STICKNEY e WURTS (1986) compararam o crescimento da tilápia áurea alimentadas com dietas contendo níveis de 0,0, 2,5, 5,0, 7,5 e 10,0% de óleo de bagre do canal e óleo de savelha e observaram que o melhor taxa de crescimento foi obtida pelos peixes suplementados com 10,0% de óleo de savelha.

FRACALOSSI e LOVELL (1994a,b) observaram melhores taxas de crescimento em bagre do canal alimentado com dietas suplementadas com 7% de óleo de savelha ou a mistura de sebo bovino, óleo de milho e de linhaça (1:1:1). Resultados semelhantes foram observados por SATOH *et al*. (1989 a,b) utilizando suplementação com óleo de fígado de bacalhau ou óleo de linhaça em dietas para o bagre do canal.

CHOU e SHIAU (1996) estudando o nível ótimo de lipídios na dieta para juvenis de tilápias híbridas, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus* observaram que os peixes que receberam dietas contendo 10,0 e 15,0% de lipídios obtiveram maior ganho de peso e melhor conversão alimentar quando comparado aos demais tratamentos (0,0, 5,0 e 20%). Estando em conformidade com a dieta prática (basal) deste trabalho que continha cerca de 10,44% de lipídios.

Entretanto a inclusão dos óleos de soja degomado e de linhaça, ricos em ácidos graxos linoleico e linolênico respectivamente nas dietas experimentais não promoveram variação na performance produtiva entre os tratamentos avaliados. Desta forma a relação custo benefício é preponderante para a escolha do óleo de soja como fonte de ácidos graxos para dieta da tilápia de Nilo no estudo dos parâmetros de desempenho produtivo, em concordância com NRC (1993), KANAZAWA et al. (1980) e TAKEUCHI et al., (1983) que relatam que apenas os ácidos graxos n-6 são exigidos para a tilápia.

5. 4. Parâmetros hematológicos

Os resultados obtidos nas análises hematológicas [número de eritrócitos (Erit); percentual de hematócrito (Htc), taxa de hemoglobina (Hg) e volume corpuscular médio (VCM)] correspondente estão expressos nas Tabelas 6 e 7.

No estudo dos parâmetros hematológicos das tilápias alimentadas com ácidos graxos essenciais, verificou-se que as variações da série eritrocitária, corroboram com outros estudos com *Oreochromis niloticus* (UEDA *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2002; TAVARES-DIAS e MORAES, 2003).

De acordo com os resultados das análises hematológicas pode-se constatar que apesar de ter sido observada diferenças significativas para o número de eritrócitos e taxa de hemoglobina entre os tratamentos e diferenças para todos os parâmetros hematológicos avaliados antes e depois do implante da lamínula pouco se pode inferir quanto essas variáveis.

A eritropoiese e a leucopoiese são influenciados por fatores biológicos como a reprodução, o sexo, a maturação gonadal, a idade, o estado nutricional e de higidez e o estresse. Da mesma forma sofrem influência de fatores ambientais como a temperatura, o pH, concentração de oxigênio dissolvido na água e sazonalidade (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

No estudo das variáveis hematológicas durante o decorrer do tempo, não foi observada variação significativa para os parâmetros eritrocitários avaliados dois dias após o inicio do processo inflamatório (número de eritrócitos, percentual de hematócrito, taxa de hemoglobina e volume corpuscular médio). Entretanto nota-se o aumento no número de eritrócitos, mas principalmente no valor de hematócrito, taxa de hemoglobina e volume corpuscular médio entre os diferentes tratamentos, quatro dias após o implante. Tais resultados estão de acordo com a resposta de acúmulo celular na lamínula no quarto dia após o implante (item 5.6) no qual se observou aumento significativo do número de macrófagos e gigantócitos demonstrando inter-relação da dinâmica da resposta do organismo ao agente estranho e do perfil hematológico.

MOURENT *et al*. (2005) trabalharam com a substituição do óleo de peixe pelo óleo de colza, linhaça e oliva em dietas para “European seabass” (*Dicentrarchus labrax* L.) e não observaram diferença significativa para a taxa de hematócrito e o número de eritrócitos circulantes entre os diferentes grupos deste ensaio.

Quanto ao número de eritrócitos, pode-se constatar que no dia zero e quatro houve diferença significativa para esse parâmetro sendo que os animais que receberam a dieta com 25:75 apresentaram os maiores valores.

Para o percentual de hematócrito não observou-se diferença estatística entre os tratamentos avaliados, entretanto, nota-se leve tendência a maior porcentagem de hematócrito na dieta contendo 25% óleo de soja e 75% de óleo de linhaça. Esses resultados estão de acordo aos encontrados por BELL *et al.* (1996) que observaram que salmão do Atlântico alimentado com dietas suplementadas com óleo de linhaça e óleo de girassol não interferiram significativamente sobre percentual de hematócrito, atividade da lisozima e de complemento.

Quanto ao volume corpuscular médio pode-se observar que não houve diferença entre os tratamentos ($P>0,05$), entretanto para a taxa de hemoglobina houve diferença significativa para os peixes alimentados com dietas suplementadas com dietas contendo 25:75 quatro dias após o implante.

Tais resultados evidenciam um paralelo à resposta orgânica da tilápia no quarto dia após a implantação da lamínula no que diz respeito à resposta inflamatória granulomatosa em que pode-se observar diferença no número de gigantócitos e que os peixes alimentados com dietas contendo 50:50 (OS:OL) e 75:25 obtiveram melhor resposta.

Resultados hematológicos semelhantes foram encontrados por SUBHADRA *et al*. (2006) trabalhando com dietas suplementadas com 10% de óleo de canola, gordura de frango, óleo de savelha ou mistura de gordura de frango:óleo de savelha (50:50) para largemouth bass (*Micropterus salmoides*).

Em similar ensaio, MONTERO et al. (2003) trabalhando com “gilthead seabream” (*Sparus aurata*) alimentados com dietas contendo óleo de soja, óleo de

colza e óleo de linhaça ou a mistura desses óleos comparadas com a dieta controle contendo óleo de peixe não foram encontrados diferenças para o percentual de hematócrito e taxa de hemoglobina enquanto que o número de células vermelhas circulante foi significativamente mais elevado nos peixes alimentados com óleo de peixe se comparada com os peixes que receberam dietas contendo óleos vegetais.

KLINGER *et al*. (1996) encontraram menor susceptibilidade a lises dos eritrócitos de bagre do canal alimentado com óleo de savelha quando comparada com os eritrócitos dos peixes alimentados com óleo de soja. Este fato pode ocorrer devido à variação do perfil de ácidos graxos nas células vermelhas, as quais podem alterar as propriedades da membrana tais como a resistência osmótica (HAVAGE *et al*, 1991). Resultados semelhantes foram observados por ERDAL *et al*. (1991) que ao estudarem a relação entre a inclusão de vários níveis de vitamina C e ácidos graxos n-3 em dietas para salmão do Atlântico, observaram que o n-3 diminui a fragilidade dos eritrócitos.

BALFRY et al. (2006) estudaram a substituição do óleo de anchova pelo óleo de canola e gordura de frango para salmão do Atlântico e não observaram diferença significativa para os diferentes tratamentos quanto ao percentual de hematócrito, contagem diferencial de leucócitos, eritrócitos totais, atividade hemolítica sérica e atividade do “burst” respiratório.

Tabela 6 - Valores médios[1], erro padrão e o resultado da análise de variância[2] do número de eritrócitos (Erit) e percentual de hematócrito (Htc) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções.

Tratamentos	**Número de eritrócitos (10^6/mm^3)**				
	Dia 0	**Dia 02**	**Dia 04**	**Dia 06**	**Dia 08**
100% OS	2,09±0,08^{ABab}	1,83±0,08^{Aa}	1,86±0,08^{Aa}	1,98±0,08^{Aab}	2,15±0,08^{Ab}
75%OS+25%OL	1,82±0,08^{Aa}	2,07±0,08^{Aab}	2,04±0,08^{ABab}	1,92±0,08^{Aab}	2,10±0,08^{Ab}
50%OS+50%OL	1,96±0,08^{ABa}	2,09±0,08^{Aab}	2,09±0,08^{ABab}	1,93±0,08^{Aa}	2,29±0,08^{Ab}
25%OS+75%OL	2,13±0,08^{Bab}	2,13±0,08^{Aab}	2,25±0,08^{Bab}	1,99±0,08^{Aa}	2,34±0,08^{Ab}
100% OL	2,04±0,08^{ABa}	1,98±0,08^{Aa}	2,13±0,08^{Aba}	2,14±0,08^{Aa}	2,24±0,08^{Aa}
Valor de F	2,535	2,249	3,319	1,247	1,500
Pr > F[3]	0,0409	0,0644	0,0114	0,2913	0,2026
Tratamentos	**Percentual de hematócrito (%)**				
	Dia 0	**Dia 02**	**Dia 04**	**Dia 06**	**Dia 08**
100% OS	33,23±2,30^{Ab}	25,39±2,30^{Aab}	33,02±2,30^{Ab}	30,24±2,30^{Aab}	24,54±2,30^{Aa}
75%OS+25%OL	31,35±2,30^{Aa}	28,14±2,30^{Aa}	34,93±2,30^{Aa}	33,24±2,30^{Aa}	29,04±2,30^{Aa}
50%OS+50%OL	32,42±2,30^{Aa}	28,36±2,30^{Aa}	35,61±2,30^{Aa}	33,49±2,30^{Aa}	28,67±2,30^{Aa}
25%OS+75%OL	34,83±2,30^{Aa}	31,02±2,30^{Aa}	38,97±2,30^{Aa}	33,38±2,30^{Aa}	30,84±2,30^{Aa}
100% OL	33,32±2,30^{Aa}	26,29±2,30^{Aa}	34,24±2,30^{Aa}	33,32±2,30^{Aa}	30,41±2,30^{Aa}
Valor de F	0,309	0,892	0,944	0,369	1,179
Pr > F[3]	0,8717	0,4688	0,4390	0,8305	0,3205

(1) Média aritmética de 50 mostras de sangue mensais (5 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Pr>F - Probabilidade de significância de F

Tabela 7 - Valores médios[1], erro padrão e o resultado da análise de variância[2] do volume globular médio (VCM) e taxa de hemoglobina (Hg) da tilápia do Nilo alimentadas com dietas suplementadas com ácidos graxos em diferentes proporções.

Tratamentos	**Taxa de hemoglobina (g/dL)**				
	Dia 0	**Dia 02**	**Dia 04**	**Dia 06**	**Dia 08**
100% OS	11,24±0,46^{Ab}	9,19±0,46^{Aa}	10,19±0,46^{ABab}	10,59±0,46^{Aab}	11,65±0,46^{Ab}
75%OS+25%OL	9,64±0,46^{Aab}	10,62±0,46^{Aab}	10,30±0,46^{ABab}	9,01±0,46^{Aa}	10,71±0,46^{Ab}
50%OS+50%OL	10,21±0,46^{Aab}	9,71±0,46^{Aa}	9,55±0,46^{Aa}	9,49±0,46^{Aa}	11,64±0,46^{Ab}
25%OS+75%OL	10,60±0,46^{Aab}	9,58±0,46^{Aa}	11,57±0,46^{Bb}	9,17±0,46^{Aa}	11,74±0,46^{Ab}
100% OL	10,34±0,46^{Aab}	9,25±0,46^{Aa}	10,98±0,46^{ABb}	10,22±0,46^{Aab}	11,63±0,46^{Ab}
Valor de F	1,614	1,569	2,876	2,204	0,876
Pr > F[3]	0,1712	0,1830	0,0236	0,0691	0,4784
Tratamentos	**Volume corpuscular médio (μ^3)**				
	Dia 0	**Dia 02**	**Dia 04**	**Dia 06**	**Dia 08**
100% OS	157,12±8,78^{Abc}	138,12±8,78^{Aab}	179,61±8,78^{Ac}	152,63±8,78^{Abc}	114,22±8,78^{Aa}
75%OS+25%OL	173,21±8,78^{Ab}	135,91±8,78^{Aa}	168,81±8,78^{Ab}	173,83±8,78^{Ab}	136,08±8,78^{Aa}
50%OS+50%OL	164,85±8,78^{Abc}	134,26±8,78^{Aab}	170,33±8,78^{Ac}	172,77±8,78^{Ac}	125,67±8,78^{Aa}
25%OS+75%OL	162,19±8,78^{Ab}	145,27±8,78^{Aab}	171,62±8,78^{Ab}	170,01±8,78^{Ab}	130,22±8,78^{Aa}
100% OL	162,95±8,78^{Aa}	132,42±8,78^{Aa}	160,44±8,78^{Aa}	156,22±8,78^{Aa}	135,07±8,78^{Aa}
Valor de F	0,455	0,321	0,608	1,275	1,021
Pr > F[3]	0,7760	0,8634	0,6567	0,2799	0,3965

(1) Média aritmética de 50 mostras de sangue mensais (5 tratamentos x 10 animais por tratamento), comparadas nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Pr>F - Probabilidade de significância de F

5.6. Estudo da cinética de macrófagos sobre a resposta inflamatória

A avaliação da resposta inflamatória crônica analisada pela cinética de formação de macrófagos policariontes em lamínulas de vidro, implantadas no tecido subcutâneo das tilápias alimentadas com ácidos graxos essenciais estão expressas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Valores médios[1] transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 02 e 04 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

Tratamentos		Número de núcleos						
		1	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 02	**100% OS**	$2,16^{ABa}$ (0,08)	$0,75^{ABa}$ (0,08)	$0,11^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$2,11^{ABa}$ (0,08)	$0,84^{ABa}$ (0,08)	$0,08^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$2,04^{Aa}$ (0,08)	$0,53^{Aa}$ (0,08)	$0,14^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$2,38^{Ba}$ (0,08)	$0,97^{Ba}$ (0,08)	$0,25^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	100% OL	$2,28^{ABa}$ (0,08)	$0,81^{ABa}$ (0,08)	$0,28^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
Valor de F		3,290	4,043	1,548	0,000	0,000	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,0134	0,0041	0,1922	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
Dia 04	**100% OS**	$3,01^{Ab}$ (0,08)	$1,73^{Ab}$ (0,08)	$1,00^{Ab}$ (0,07)	$0,14^{Aa}$ (0,06)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$3,09^{Ab}$ (0,08)	$1,74^{Ab}$ (0,08)	$1,02^{Ab}$ (0,07)	$0,25^{ABb}$ (0,06)	$0,04^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$3,08^{Ac}$ (0,08)	$1,98^{Ab}$ (0,08)	$1,33^{Bb}$ (0,07)	$0,60^{Cb}$ (0,06)	$0,18^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$3,06^{Ab}$ (0,08)	$1,95^{Ab}$ (0,08)	$1,17^{ABb}$ (0,07)	$0,43^{BCb}$ (0,06)	$0,04^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
	100% OL	$3,09^{Ab}$ (0,08)	$1,76^{Ab}$ (0,08)	$0,98^{Ab}$ (0,07)	$0,34^{ABb}$ (0,06)	$0,09^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,07)	$0,00^{Aa}$ (0,05)
Valor de F		0,210	2,314	4,499	8,283	1,009	0,000	0,000
Pr > F[4]		0,9326	0,0612	0,0020	0,0000	0,4051	1,0000	1,0000

(1) Média aritmética de 175 contagens por dia (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).
(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.
(3) Células de Langhans./ (4) Pr>F - Probabilidade de significância de F.

Tabela 9 – Valores médios[1] transformados em log (x + 1), erro padrão e o resultado da análise de variância[2] das contagens de células nas lamínulas no dia 06 e 08 após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

Tratamentos[3]		Número de núcleos						
		1	**2**	**3 a 5**	**6 a 10**	**11 a 20**	**>20**	**Cel. Lang.[4]**
Dia 06	**100% OS**	$2,99^{Ab}$ (0,08)	$1,95^{Ab}$ (0,08)	$1,54^{Ac}$ (0,07)	$1,18^{Ab}$ (0,06)	$0,69^{Ab}$ (0,07)	$0,53^{Ab}$ (0,07)	$0,14^{Aa}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$3,03^{Ab}$ (0,08)	$2,02^{Ab}$ (0,08)	$1,54^{Ac}$ (0,07)	$1,07^{Ac}$ (0,06)	$0,72^{Ab}$ (0,07)	$0,27^{Ab}$ (0,07)	$0,04^{Aa}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$3,03^{Abc}$ (0,08)	$2,01^{Ab}$ (0,08)	$1,62^{Ac}$ (0,07)	$1,16^{Ac}$ (0,06)	$0,90^{Ac}$ (0,07)	$0,43^{Ab}$ (0,07)	$0,04^{Aa}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$3,04^{Ab}$ (0,08)	$1,90^{Ab}$ (0,08)	$1,49^{Ac}$ (0,07)	$1,10^{Ac}$ (0,06)	$0,78^{Ab}$ (0,07)	$0,29^{Ab}$ (0,07)	$0,09^{Aa}$ (0,05)
	100% OL	$2,89^{Ab}$ (0,08)	$1,95^{Ab}$ (0,08)	$1,47^{Ac}$ (0,07)	$1,07^{Ac}$ (0,06)	$0,84^{Ab}$ (0,07)	$0,52^{Ab}$ (0,07)	$0,48^{Bb}$ (0,05)
Valor de F		0,681	0,384	0,637	0,674	1,585	2,122	14,481
Pr > F[4]		0,6058	0,8196	0,6368	0,6110	0,1823	0,0818	0,0000
Dia 08	**100% OS**	$2,86^{Ab}$ (0,08)	$1,85^{Ab}$ (0,08)	$1,43^{Ac}$ (0,07)	$1,03^{Ab}$ (0,06)	$0,67^{ABb}$ (0,07)	$0,60^{ABb}$ (0,07)	$0,45^{ABb}$ (0,05)
	75%OS+ 25%OL	$2,95^{Ab}$ (0,08)	$1,85^{Ab}$ (0,08)	$1,41^{Ac}$ (0,07)	$1,05^{Ac}$ (0,06)	$0,91^{Bb}$ (0,07)	$0,76^{Cc}$ (0,07)	$0,38^{Ab}$ (0,05)
	50%OS+ 50%OL	$2,78^{Ab}$ (0,08)	$1,82^{Ab}$ (0,08)	$1,38^{Abc}$ (0,07)	$0,93^{Ac}$ (0,06)	$0,62^{Ab}$ (0,07)	$0,48^{Ab}$ (0,07)	$0,62^{BCb}$ (0,05)
	25%OS+ 75%OL	$2,81^{Ab}$ (0,08)	$1,87^{Ab}$ (0,08)	$1,35^{Abc}$ (0,07)	$0,94^{Ac}$ (0,06)	$0,69^{ABb}$ (0,07)	$0,63^{ABc}$ (0,07)	$0,69^{Cb}$ (0,05)
	100% OL	$2,91^{Ab}$ (0,08)	$1,87^{Ab}$ (0,08)	$1,43^{Ac}$ (0,07)	$1,06^{Ac}$ (0,06)	$0,88^{ABb}$ (0,07)	$0,62^{ABb}$ (0,07)	$0,73^{Cc}$ (0,05)
Valor de F		0,854	0,073	0,233	1,023	3,842	3,199	10,257
Pr > F[4]		0,4935	0,9903	0,9192	0,3976	0,0056	0,0154	0,0000

(1) Média aritmética de 175 contagens por dia (5 tratamentos x 7 animais por tratamento x 5 campos por animal), comparados nas colunas, com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

(2) Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.

(3) Células de Langhans

(4) Pr>F - Probabilidade de significância de F

O recrutamento de macrófagos, formação de células de gigantes e todo seu processo de maturação, com acúmulo de vários macrófagos e a transformação de células gigantes tipo corpo estranho em células de Langhans, refletem o bom desempenho de reação inflamatória mediante a suplementação alimentar com ácidos graxos na dieta para tilápia do Nilo. No presente estudo pode-se observar que a cinética do acúmulo de macrófagos ocorreu desde a primeira coleta (segundo dia) em todos os tratamentos ($P>0,05$), sendo constatada a presença de macrófagos espalhados por toda a lamínula assim como de alguns gigantócitos, com dois e três a cinco núcleos. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por PETRIC *et al*., (2003 a,b); BRUM (2003), BELO *et al*., (2005), BELO (2006) que logo após o implante das lamínulas observaram acúmulo de macrófagos por toda a sua extensão.

O recrutamento de macrófagos e a formação de policariontes com dois ou três a cinco núcleos foram visto no segundo dia e a presença destas células intensificou gradativamente com o tempo, onde o fenômeno evoluiu e o número de gigantócitos aumentou progressivamente até o oitavo dia após o implante (Figura 7). A evolução do processo inflamatório em função do tempo apresenta aumento crescente e significativo entre os dias dois, quatro, seis e oito para as contagens de células nas lamínulas, corroborando aos achados por PETRIC *et al.* (2003b) e BELO (2006).

Nas lamínulas referentes ao quarto dia pode-se observar aumento significativo ($P<0,05$) do número de macrófagos e gigantócitos não só daqueles com dois e três a cinco núcleos, mas também gigantócitos com número maior de núcleos (seis a dez e 11 a 20) demonstrando a dinâmica da resposta do organismo ao agente estranho. Tais resultados estão em concordância com as observações descritas para as análises hematológicas (item 5.5) no quarto dia, confirmando a hipótese de que a suplementação com 25:75 (OS:OL) na dieta favoreceu a resposta fisiológica das tilápias submetidas ao processo cirúrgico de implante da lamínula.

O aumento nas contagens de macrófagos e gigantócitos com quatros dias confirmam a hipótese de que o pico de resposta de defesa das tilápias,

submetidas ao estímulo inflamatório crônico, ocorre em torno deste período corroborando aos achados de BELO (2006).

No sexto dia pode-se observar uma estabilização do número de macrófagos e gigantócitos de dois núcleos ($P>0,05$) quando comparados às lamínulas do quarto dia. Entretanto para aqueles gigantócitos com número maior de células (três a cinco, seis a dez e 11 a 20) observou-se que a porcentagem dessas células foi maior ($P<0,05$) do que as coletas anteriores. Pode ser constatado ainda, não só a presença de gigantócitos tipo corpo estranho, com mais de 20 núcleos aleatoriamente dispostos por todo o citoplasma, mas também do tipo Langhans, cujos núcleos estão dispostos na periferia do citoplasma conferindo o aspecto de "coroa" (Figura 8). Houve ainda precocidade na formação de gigantócitos tipo Langhan nos peixes alimentados com 100% de óleo de linhaça ao sexto dia ($P<0,0001$).

No oitavo dia, pode-se observar que a cinética dos macrófagos e a formação dos gigantócitos nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo evoluiu progressivamente. Não houve diferença significativa entre o número de macrófagos e gigantócitos com até 10 núcleos ($P>0,05$) para os diferentes tratamentos. Contudo, verifica-se que nas tilápias alimentadas com ácidos graxos na proporção (OS:OL) de 50:50, 25:75 e 0:100 ocorreu maior formação de células tipo Langhans. Este fato ocorreu possivelmente devido a influência da inclusão do óleo de linhaça na dieta dos peixes sobre a resposta inflamatória já que no sexto dia observou-se maior formação de células de Langhans nas lamínulas implantadas dos peixes suplementados com a dieta contendo 100% de óleo de linhaça. Estes achados evidenciam a importância da participação dos ácidos graxos nos mecanismos fisiopatológicos da inflamação crônica, observados por meio do recrutamento de macrófagos e a formação de gigantócitos nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo desses animais.

Sabe-se que a formação de células gigantes depende do recrutamento diário de macrófagos originários da transformação morfofisiológica de monócitos da corrente sanguínea (GILLMAN e WRIGHT, 1966; RYAN e SPECTOR, 1970, MARIANO e SPECTOR, 1974) para o foco inflamatório (BIRMAN e MARIANO,

1985). Uma vez no foco os macrófagos recém recrutados fundem suas membranas para formar as células gigantes (MARIANO e SPECTOR, 1974). Nestas circunstancias ocorre à formação de pontes citoplasmáticas entre as duas células, possibilitando a formação de macrófagos policariontes. Esses gigantócitos recém formados possuem núcleos distribuídos aleatoriamente pelo citoplasma, caracterizando a célula tipo corpo estranho. Gradativamente os núcleos se organizam na periferia do citoplasma formando as células de Langhans (MARIANO e SPECTOR, 1974), como observado neste estudo ao sexto dia após o implante da lamínula no tecido subcutâneo das tilápias suplementadas com 100% de óleo de linhaça na dieta basal. Assim as células de Langhans representam macrófagos policariontes mais maduros ou evoluídos do que os do tipo corpo estranho.

A importância da formação de células gigantes no contexto da reação inflamatória não está bem esclarecida. Segundo estudos realizados por MARIANO e SPECTOR (1974) as células gigantes do tipo Langhans possuem maior atividade de fosfatase ácida e de hidrogenase succínica, além de sistema de Golgi mais desenvolvido e de distribuição mais ordenada das organelas celulares, provocando certa vantagem na transformação morfofisiológica frente a uma situação de resposta inflamatória celular. ENELOW *et al*. (1991) demonstraram que em humanos as células gigantes possuem maior atividade contra *Cândida albicans* se comparada aos macrófagos, pois apresenta maior atividade oxidativa.

Os resultados supracitados demonstram que após o implante das lamínulas o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos com dois e três a cinco núcleos foram observados após dois dias do processo cirúrgico em todas as dietas experimentais avaliadas, entretanto pode-se constatar que os peixes alimentados com 25:75 (OS:OL) apresentaram acúmulo significativamente maior de macrófagos e células policariontes com dois núcleos se comparado aos demais tratamentos ($P<0,05$). Tais resultados estão em concordância com as observações descritas para as análises hematológicas no segundo dia, confirmando a hipótese de que a suplementação com 25:75 (OS:OL) na dieta favoreceu a resposta fisiológica das tilápias submetidas ao processo cirúrgico.

Em peixes, a formação de macrófagos policariontes está descrita em diversas situações de parasitismo ou presença de corpo estranho em diferentes espécies. Existe a descrição de gigantócitos tipo corpo estranho e de Langhans em *Paulicea lutkeni* na presença do parasito *Jauela glandicephalus* (cestoda; Proteocephalidae) (EIRAS e REGO, 1989), em presença do implante de tecido ósseo desmineralizado de *Aeromonas anguilla* em *Scyliorhinus canícula* (PEINGOUX-DEVILLE *et al*., 1989), em presença da larva encapsulada L3 de *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea*)* em *Oncorhynchus mykiss* (RAMAKRISHINA e BURT, 1991).

Foram descritas ainda a formação de células gigantes em processos inflamatórios granulomatosos com diversas enfermidades infecciosas, tais como a causada pela *Edwardsiella tarda* em tilápia nilótica (MIYAZAKI e KAIGE, 1985), *Ichthyophonus hoferi* em *Pleuronectes platessa* (TIMUR e TIMUR, 1984) e *Mycrosporidium* sp. na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (PUSLFORD e MATHEUS, 1991).

Estudos *in vitro* com macrófagos de peixes avaliaram o processo evolutivo de diferenciação e fusão dos macrófagos, verificando-se o início da formação de células gigantes 24 horas em *Sparus aurata* (COUSO *et al*., 2002), dois a três dias em *Cyprinus carpio* (BAYNE, 1986) e depois de uma semana em *Oncorhynchus mykiss* (SECOMBES, 1985). Esses achados demonstraram a especificidade de cada teleósteo em responder ao estímulo inflamatório. Neste estudo pode-se constatar que o modelo experimental utilizado por meio do implante da lamínula no tecido do subcutâneo da tilápia é adequado para a avaliação da cinética da formação dos macrófagos policariontes já que aos dois dias pode-se observar a resposta do organismo frente ao agente estranho, como descrito inicialmente por PETRIC *et al*., (2003 a, b). Corroborando os resultados de MATUSHIMA (1994) que avaliou o processo crônico granulomatoso induzido pela aplicação de BCG em tilápias do Nilo observou a formação de raros gigantócitos tipo corpo estranho três dias após a inoculação e que aos sete dias sua presença tornou-se mais freqüente. Estes resultados estão em concordância às observações de BRUM

(2003) que verificaram efeito semelhante em pacus alimentados com 500 mg de vitamina C/kg de ração e mantidos em densidade elevada (20 kg/m^3).

BELO *et al*. (2005) observaram efeitos benéficos na suplementação dietética com vitamina E sobre a formação dos macrófagos policariontes em pacus mantidos em superpopulação (20 kg/m^3), havendo aumento significativo destes em grupos alimentados com 450 mg de vitamina E/kg de ração na dieta. Resultados semelhantes foram observados por BELO (2006) ao trabalhar com dietas suplementadas com 500 mg/ kg de ração de vitamina E para a tilápia do Nilo submetidas à elevada densidade (20 kg/m^3), vacinadas e desafiadas com *Mycobacterium marinum*.

Corroborando os resultados obtidos supracitados a suplementação com ácidos graxos essenciais na dieta para a tilápia do Nilo incrementou a dinâmica e o recrutamento de macrófagos no foco inflamatório.

Na literatura são raras as informações sobre a relação entre ácidos graxos e a resposta inflamatória crônica inespecífica em peixes. Porém há algumas evidências de que os ácidos graxos possam influenciar a resposta imune e a resistência às doenças na maioria dos animais, inclusive em peixes (BLAZER, 1991; BALFRY e HIGGS, 2001; GATLIN, 2002).

Neste trabalho, observou-se que peixes alimentados com dietas suplementadas com os óleos de soja e linhaça em diferentes proporções demonstraram acúmulo de macrófagos na lamínula em todos os tratamentos a partir do segundo dia após a cirurgia. Nesse dia observa-se ainda que houve maior acúmulo de macrófagos e policariontes com dois núcleos ($P<0,05$) e com três a cinco núcleos ($P>0,05$) nos peixes que receberam a dieta contendo 25:75 (Figura 9). Com o decorrer do tempo a resposta do organismo tornou-se mais intensa e o número de gigantócitos aumentou progressivamente até o oitavo dia. Pode-se constatar que a dinâmica de resposta ao processo inflamatório apresentou diferença significativa ($p<0,05$) no acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos nas lamínulas nos diferentes tempos de coleta (dois, quatro, seis e oito dias).

O mecanismo pelas quais os ácidos graxos presentes na dieta de peixes atuam sobre a resposta de defesa é atribuído, em parte, à composição lipídica da membrana e suas propriedades físicas, que promovem a ativação da produção das citocininas, pela atuação sobre a proteína quinase C modificando os sinais de transdução e ativando receptores de membrana e pela influência na produção da prostaglandina e leucotrienos pelos macrófagos (BALFRY e HIGGS, 2001). O incremento da resposta de macrófagos observada deve ser semelhante ao verificado por BELO *et al.* (2005) mediante a suplementação alimentar com vitamina E pois esta atua como antioxidante de membranas biológicas e a sua deficiência associada ou não à deficiência de ácidos graxos insaturados está relacionada ao aumento da peroxidação lipídica (BLAZER & VOLKE, 1983; MOCCIA et al., 1984; WADA et al., 1989, 1991).

No quarto dia, pode-se constatar que a formação de macrófagos e gigantócitos policariontes com dois, três a cinco não apresentou diferença significativa entre os tratamentos. Já para o número de gigantócitos com seis a dez núcleos pode observar diferença ($P<0,05$) e que os peixes alimentados com dietas contendo 50:50 (OS:OL) e 75:25 obtiveram melhor resposta (Figura 10). Contudo para os gigantócitos com 11 a 20 núcleos não houve diferença entre os tratamentos porém as proporções 50:50 e 0:100 continuaram apresentar melhor resposta.

No sexto dia após o implante, pode-se observar que o recrutamento de macrófagos e a formação de gigantócitos com mais de 20 núcleos, inclusive os gigantócitos tipo corpo estranho foi homogêneo para todos os tratamentos ($P>0,05$), contudo os animais submetidos ao tratamento contendo 0:100 (OS:OL) apresentaram maior formação de gigantócitos tipo Langhans ($P<0,05$) (Figura 11).

No oitavo dia após o processo cirúrgico, pode-se constatar que não houve diferença significativa para o acúmulo de macrófagos e gigantócitos com até dez núcleos. Pode-se observar ainda que o número de gigantócitos com 11 a 20 e maior que 20 núcleos foi maior nos peixes alimentados com a dieta contendo 75:25 (OS:OL). Entretanto em relação às células de Langhans, os animais submetidos à suplementação com 50:50, 25:75 e 0:100 apresentaram maior

formação de gigantócitos do tipo de Langhans (Figura 12) em contrapartida aos que receberam a dieta 100:0 e 75:25, demonstrando atraso destes animais quanto à formação desse tipo de célula especializada. Esse fato sugere que a suplementação com fontes de ácidos graxos essenciais n-6 (OS) e n-3 (OL) nas proporções de 50:50; 25:75 e 0:100 na dieta para tilápia do Nilo favorece o acúmulo de macrófagos e a formação de gigantócitos policariontes, principalmente as células de Langhans.

Assim, os resultados tomados em conjunto sugerem que a suplementação dietária com ácidos graxos essenciais utilizados na dieta para *Oreochromis niloticus* exerce ações benéficas no organismo de peixes mantidos em confinamento, principalmente no que tange os mecanismos fisiopatológicos do processo inflamatório crônico por corpo estranho. Todavia, mais investimentos científicos devem ser realizados a fim de complementar os resultados obtidos até o presente momento, tais como o desafio dos peixes alimentados com dietas suplementadas com diferentes níveis de ácidos graxos a diferentes cepas bacterianas e a quantificação do título de anticorpos séricos, dentre outros parâmetros imunológicos que possam corroborar com o observado neste estudo.

Figura 7 – Presença de macrófagos (M), pequenos policariontes (P) e gigantócitos (G)

Figura 8 – Gigantócito tipo Langhans (L)

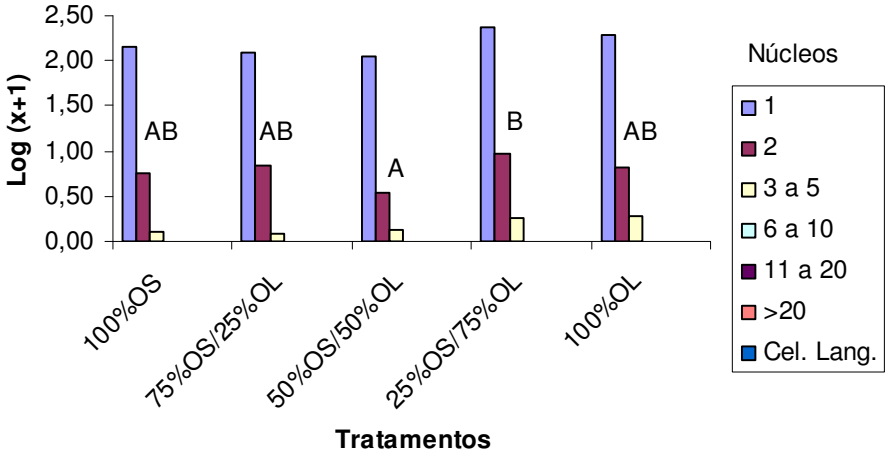

Figura 9 – Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas dois dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

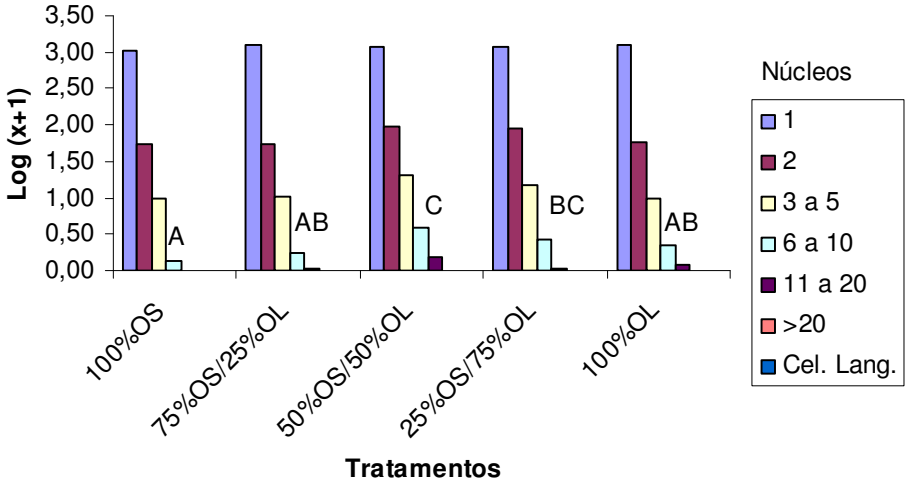

Figura 10 – Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas quatro dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

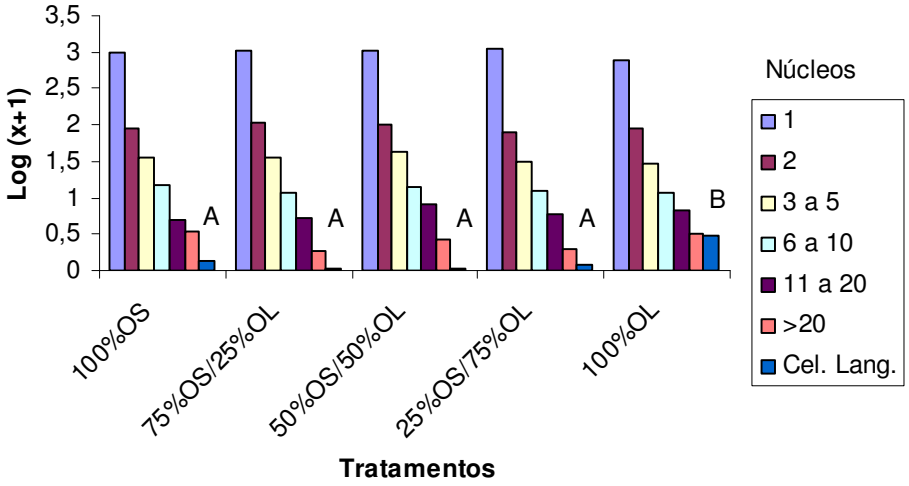

Figura 11 – Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas seis dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

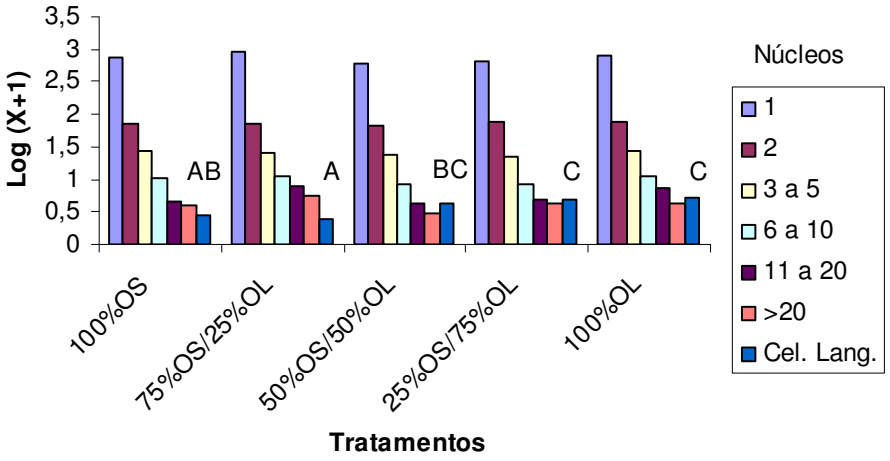

Figura 12 – Valores médios transformados em log (x+1) das contagens de células presentes nas lamínulas oito dias após o implante no tecido subcutâneo de tilápia do Nilo, submetidas aos diferentes tratamentos com ácidos graxos na dieta.

CONCLUSÕES

No estudo da suplementação alimentar com ácidos graxos essenciais na dieta para tilápia do Nilo nas proporções (óleo de soja: óleo de linhaça): 0:100; 25:75; 50:50 75:25 e 0:100 sobre o desempenho produtivo, perfil hematológico e inflamação crônica podem-se inferir que:

- A suplementação com fontes de ácidos graxos essenciais n-6 (OS) e n-3 (OL) na dieta para tilápia do Nilo incrementou a resposta inflamatória crônica pelo acúmulo de macrófagos e formação de gigantócitos tipo corpo estranho e Langhans nas lamínulas implantadas no tecido subcutâneo;

- A inclusão da mistura de 50:50 (OS:OL) na dieta para tilápia do Nilo já proporcionou a maior formação de gigantócitos tipo Langhans;

- A suplementação dietária com ácidos graxos essenciais não interferiu nos parâmetros de desempenho produtivo e perfil hematológico avaliados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDOH, A.; TSUJIKAWA, T., ISHIZUKA, I. *et al*. ω-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis. **Int. J. Mol. Med**.; v. 12, p. 721-725, 2003.

ASHTON, I.; CLEMENTS, K.; BARROW, S. E.; SECOMBES, C. J.; ROWLEY, A. F. Effects of dietary fatty acids on eicosanoid-generating capacity, fatty acid composition and chemotactic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1214, p. 253-262, 1994.

BALFRY, S. K.; OAKES, J.; ROWSHANDELI, M.; DEACON, GREG; SKURA, B.; HIGGS, D. A. Efficacy of an equal blend of canola oil and poultry fat as an alternate dietary lipid source for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater. II: effects on haematology and immunecompetence. **Aquaculture Research**, v. 37, 192-199, 2006.

BALFRY, S. K.; HIGGS, D. A. **Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistence of finfish**. In: *Nutrition and Fish Health* (Lim, C. & Webster, C. D. eds), pp.213-234. Food Product Press, Binghampton NY, USA, 2001.

BAYNE, C. J. Pronephric leucocytes of *Cyprinus carpio:* isolation, separation and characterization. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 141-151, 1986.

BELL , J, G., ASHTON, I., SECOMBES, C. J., WEITZEL, B. R., DICK, J. R.; SARGENT, J. R. Dietary lipids affets phospholipid fatty acid compositions, eicosanoid production and immune function in Atlantic salmon (*Salmo salar)*. **Prostaglandin, Leukot. Essent. Fat. Acids**, v. 54, p. 173-182, 1996.

BELL, J. G.; MCEVOY, J.; TOCHER, D. R.; MCGHEE, F.; CAMPBELL, P. J.; SARGENT, J. R. Replacement of fish with rapeseed oil in diets of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects tissue lipids composition and hepatocyte fatty acid metabolism. **J Nutr**., v. 131, p. 1535-1543, 2001.

BELL, J. G.; HENDERSON, R. J.; TOCHER, D. R.; MCGHEE, F.; DICK, J. R.; PORTER, A.; SMULLEN, R. P.; SARGENT, J. R. Substituting fish oil with crude palm oil in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) affects muscle fatty acid composition and hepatic fatty acid metabolism. **J. Nutr**., v. 132, p. 222-230, 2002.

BELL, J. G.; MCGHEE, F.; CAMPBELL, P. J.; SARGENT, J. R. Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-molt Atlantic salmo (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil 'wash out'. **Aquaculture**, v. 218, p. 515-528, 2003.

BELO, M. A. A., SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M.; MORAES, J. E. R. Effects of dietary suplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 133, p. 146-154, 2005.

BELO, M. A. A. **Recrutamento de macrófago e formação de gigantócitos em *Oreochromis niloticus*, submetidas a diferentes estímulos moduladores**. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Tese de Doutorado), 146p., 2006.

BELO, M.A.A**. Efeito do estresses por superpopulação e da suplementação alimentar com vitamina E sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887**. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Dissertação de Mestrado), 76 p, 2002.

BIRMAN E.G.; MARIANO M. The influence of inflammatory agents on giant cell formation. **Brazilian Journal of Biological Research**, v. 18, p. 507-512, 1985.

BLAZER, V. S. **Nutrition and disease resistance in fish**. Annual Review of Fish Disease v. 2, p. 309-323, 1992.

BLAZER, V.S.; WOLKE, R.E. Ceroid deposition, retinal degeneration and renal calcium oxalate crystals in culture clownfish. **Jounal of Fish Diseases**, v.1, p. 3-26, 1983.

BRANSDEN, M. P., CARTER, C. G. & NICHOLS, P., D. Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 135, p. 611-625, 2003.

BRUM, C.D. **Vitamina C favorece a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus Holmberg,* 1887 mantidos em diferentes densidades**. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 58 p., 2003.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P.; HARVEY, D. J.; WATTS, A.; NEWSHOLME, E. A. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity, **Biochem. J**., v. 300, p. 509-518, 1994.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 297-304, 2001.

CASTAGNOLLI, N.; CYRINO, J. E. **Piscicultura nos trópicos**. São Paulo: Manole, 1986. 152p.

CHANG, H. R.; DULLOO, I. R.; VLADOIANU, I. R.; PIGUET, P. F.; ARSENIJEVIC, D.; GIRARDIER, L.; PECHERE, J. C. Fish oil decreases natural resistance of mice to infection with *Salmonella typhimurium*. **Metabolism,** v. 41, p. 1-2, 1992.

CHAPKIN, R. S.; HUBBARD, N. E., ERICKSON, K. L. 5-series peptidoleukotriene synthesis in mouse peritoneal macrophages: modulation by dietary n-3 fatty acids. **Biochem. Biophys. Res. Commun**., v. 171, p. 764-769, 1990.

CHOU, B.; SHIAU, S. Optimal dietary lipid level for growth of juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. **Aquaculture***,* v. 143, p. 185-195, 1996.

CHOU, B.; SHIAU, S. Y. Both n-6 and n-3 fatty acids are required for maximal growth of juvenile hybrid tilapia. **North Am. J. Aquacult**., v. 61, p.13-20, 1999.

COUSO, N. Formulation of short-lived multinucleated gigants cells (MGCS) from cultured gilthead seabream macrophagos. **The anatomical Records**, v.267, p. 204-212, 2002.

DELUCA, P.; ROSSETTI, R. G.; ALAVIAN, C.; KARIM, P.; ZURIER, R. B. Effects of gammalinolenic acido on interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha secretion by stimulated human peripheral blood monocytes: studies *in vitro* and *in vivo.* **J. Invest. Med**.; v. 47, p. 246-250, 1999.

DOOPER, M. M.; VAN RIEL, B; GRAUS, Y. M.; M'RABET, L. Dihomo-gama-linolenic acid inhibits tumour necrosis factor-alpha production by human leucocytes independently of cyclooxygenase activity. **Immunology***;* v. 110, p. 348-357, 2003.

DOSANIJH, B. S.; HIGGS, D. A.; PLOTNIKOFF, M. D.; MARKERT, J. R.; BUCKELY, J. T. Preliminary evalution of canola oil, pork lard and marine lipid sources for juvenile fall Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, v. 68, p. 325-343, 1988.

EIRAS, J. C.; REGO, A. A. Giant cell reaction associated with *Paulicea lutkeni* (Osteichthyes, Pimelodidae) infection with *Jauela glanficephalus* (Cestoda, Proteocephalidae). **Revista Ibérica de Parasitologia**, v. 49, n. 3, p. 217-218, 1989.

EL-SAYED, A.M. & KAWANNA, M. Effects of photoperiod on the performance of farmed Nile tilapia *Oreochromis niloticus*: L. Growth, feed utilization efficiency and survival of fry and fingerlings. **Aquaculture**, v. 231, p. 393-402, 2004.

ENDREAS, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V. E.; GEORGILIS, K. LONEMANN, G.; VAN DER MEER, J. M. V.; CANNOM, J. G.; ROGERS, T. S., KLEMPNER, M. S.; WEBER, P. C. SCHAEFFER, E. J.; WOLFF, M. S.; DINARELLO, C. A. The effect of dietary supplementation with ω-3 polyunsaturated fattys acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cell. **N. Engl. J. Med**., v. 320, p. 265-271, 1989.

ENELOW, R. I.; SULLIVAN, G. W.; CARPER, H. T. Cytocin-induced human multinucleated giant cells have enhanced candidacidal activity and oxidative capacity compared with macrophages*,* **J. Infec. Dis**., v. 8, p. 363-379, 1991.

ERDAL, J. J., EVENSEN, O., KAURSTAD, O. K., LILLEHAUG, A., SOLBAKKEN, R., THORUD, K. Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmon salar* L.) after feeeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. **Aquaculture,** v. 98, p. 363-379, 1991.

FRACALOSSI, D. M.; LOVELL, R. T. Growth and polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipids sources at two water temperatures. **The Progressive Fish-Culturist**, v. 57, p. 107-113, 1995.

FRACALOSSI, D. M., CRAIG-SCHMIDT, M. C.; LOVELL, R. T. Effect of dietary lipids sources on production of leukotriene B by head kidney of channel catfish held at different water temperatures. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 242-250, 1994a.

FRACALOSSI, D. M., LOVELL, R. T. Dietary lipid sources influence responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to challenge with the pathogen *Edwardsiella ictaluri.* **Aquaculture**, v. 119, p. 287-298, 1994b.

FROYLAND, L., LIE, O., BERGE, R. Mitochondrial and peroxisomal β-oxidation capacities in various tissues from Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 85-89, 2000.

FUJIMOTO, R.Y. **Suplementação alimentar com cromo para pacus *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 mantidos em duas densidades de estocagem**. Tese (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp. Jaboticabal, 132 p., 2004.

GARCIA LEME, J. **Hormones and Inflammation**, p.1-238, CRC Press, Boca Raton, 1989.

GARCIA, F. **Pacus *Piaractus mesopotamicus* (holmberg, 1887) alimentados com dietas suplementadas com vitaminas C e E e submetidos ao desafio com *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Unesp,Jaboticabal, 76 p., 2005.

GATLIN, D. M.; PENGLI, F. **Modulation of fish health and immune responses with non-nutritive dietary supplements***.* In: Anais do 1o Simpósio de Nutrição e Saúde de peixes, 7a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, 2005, 120 p.

GATLIN, D. M. Nutrition and health. Pages 671-702 in: J. E. Halver and R. W. Hardy, editors. **Fish Nutrition**. Academic Press, San Diego, California, 2002.

GILLMAN T.; WRIGHT L.J. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. **Nature***,* v. 209, p. 263-265, 1966.

GOLDMAN, D. W.; PICKETT, W. C.; GOETZL, E. L. Human neutrophil chemotactic and degranulation activities of leukotriene B_5 (LTB_5) derived from eicosapentanoic acid. **Biochem. Biophys. Res. Commun***.,* v. 117, p. 282-288, 1983.

GRECCHI R.; SALIBA, A M.; MARIANO M. Morphological changes, surface receptors and phagocytic potencials of fowls mono-nuclear phagogytes and trombocytes *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Pathology**, v.130, p.23-31, 1980.

GUILLOU, A.; SOUCY, P.; KHALIL, M.; ADAMBOUNOU, L. Effects of vegetable and marine lipid on growth, muscle fatty acid composition and organoleptic quality of flesh of brook charr (*Salvelinus fontinallis*). **Aquaculture***,* v. 136, p. 351-362, 1995.

HANLEY, F. Effects of feeding supplementary diets containing varying levels of lipid on growth, food conversion and body composition of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 93, p. 323-334, 1991.

HAVAGE, T. A., JOHANSEN, Y.; CHRISTOPHERSEN, B. The effect of n-3 fatty acids on osmotic fragility of rat erythrocytes. ***Biochim. Biophys Acta***, v. 1084, p. 251-254, 1991.

HENDERSON, R. J., TOCHER, D. R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progressive Lipid Research**, v. 26, p. 281-347, 1987.

HWANG, D. Essential fatty acids and immune response. **FASEB J**., v. 3, p. 2052-2061, 1989;

JOHNSTON, P. V. Dietary fat eicosanoids and immunity. **Adv. Lipid Res**., v. 21, p. 103-141, 1985.

KANAZAWA, A. TESHIMA, S.; SAKAMOTO, M.; AWAL, M. A. Requirement of Tilapia zillii for essential fatty acids. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**., v. 46, p. 1353-1356, 1980.

KINSELLA, J. E.; LOKESH, B. Dietary lipids, eicosanoids and the immune system. **Crit. Care Med**., v. 18, p. S94-S113, 1990.

KIRON, V., FUKUDA, H., TAKEUCHI, T., WATANABE, T. Essential fatty acid nutrition and the defense mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 111A, p. 361-367, 1995.

KLINGER, R. C.; BLAZER, V. S.; ECHEVARRIA, C. Effects of dietary lipid on the haematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus.* **Aquaculture**, v. 147, p. 225-233, 1996.

KOPPANG, E. O.; HAUGARVOLL, E.; HORDVIK, I.; AUNE, L.; POPPE, T. T. Vaccine associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic Salmon, *Salmo salar* L., white muscle. **Journal of Fish Diseases***,* v. 28, p. 13-22, 2005.

KRAGBALLE, K.; VOORHEES, J. J.; GOETZL, E. J. Inhibition by leukotriene B_5 of leukotriene B_4-induced activation of human keratinocytes and neutrophils. **J. Invest. Dermatol.**, v. 88, p. 555-558, 1987.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1ª. Edição, Jundiaí, 2000.

LEE, T. H.; HOOVER, R. J.; WILLIAMS, J. D. et al. Effects of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function **N. Engl. J. Med**., v. 312, p. 1217-1224, 1985.

LEITCH, A. G.; LEE, T. H.; RINGEL, E. W.; PRICKETT, J. D.; ROBINSON, D. R.; PYNE, S. G.; COREY, E. J.; DRAZEN, J. M.; AUSTEN, K. F.; LEWIS, R.A. Immunologically induced generation of tetraene and pentaene leukotrienes in the peritoneal cavities of menhaden-fed rats. **J. Immunol**., v. 132, p. 2559-2565, 1984.

LI, M. H.; WISE, D. J.; JOHNSON, M. R.; ROBINSON, E. H. Dietary menhaden oil reduced resistance of channel catfish (*Ictalurus puctatus*) to *Edwardsiella ictaluri*. **Aquaculture**, v.128, p. 335-344, 1994.

LIM, C., YILDIRIM-AKSOY, M., KLESIUS, P. H. **Nutrition, immune response and disease resistance in fish**. In: Anais do 1º Simpósio de Nutrição e Saúde de Peixes, 7 a 9 de novembro de 2005. Botucatu: Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual. Paulista, p. 46- 83, 2005.

LOGATO, P. V. R. **Nutrição e alimentação de peixes da água doce**. Viçosa (MG). Aprenda fácil editora, 2000. 128p.

MABÍLIA, R. G. **Alimentação e nutrição dos peixes ornamentais**. Site: www. aquaforum.com.br/ phpBB2/ viewtopic.php?p=147&, 2005.

MAGRUM, L. J.; JOHNSTON, P. V. Effect of culture *in vit*ro with eicosa-tetraenoic (20:4(n-6)) and eicosapentanoic (20:5(n-3)) acids on fatty acid composition, prostaglandin synthesis and chemiluminescence of rat peritoneal macrophages. ***Biochim. Biophys Acta***, V. 836, p. 354-360, 1985.

MARIANO M.; SPECTOR W.G. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). **Journal of Pathology***,* v. 113, p. 119, 1974.

MARTINS, M.L. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a reação inflamatória em *Piaractus mesopotamicus Holmberg,* 1887 estressados**. Tese (Doutorado em Aqüicultura) - Centro de Aqüicultura, Unesp, Jaboticabal, SP, 123 p., 2000.

MATUSHIMA, E.R. **Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Dissertação de Mestrado), 1994.

MATUSHIMA, E. R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carragenin in the swimbladder of *Oreochromis niloticus* (Nile tilápia). **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**., v. 33, n. 1, p. 5-10, 1996.

MCNALLY, A. K., ANDERSON, J. M. Foreign body-type multinuclead giant cell formation is potently induced by ∝-tocopherol and prevent by the diacylglycerol kinase inhibitor R59002. **American Journal Pathology**, v. 163, p. 1147-1156, 2003.

MCNALLY, A. K., ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of manose receptor activity. **American Journal of Pathology**, v. 149, p. 975-998, 1996.

MCNALLY, A. K., ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/ macrophages. Different lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinuclead giant cells. ***American Journal Pathology***, V. 147; p. 1487-1499, 1995.

MCNALLY, A. K., ANDERSON, J. M. Multinucleated giant cell formation exhibits features of phagocytosis with participation of the endoplasmic reticulum. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 79, p. 126-135, 2005.

MEYDANI, S. N.; ENDRES, S.; WOODS, M. M.; GOLDIM, B. R.; SOO, C.; MORRILL-LABRODE, A.; DINARELLO, C. A.; GORBACH, S. L. Oral (n-3) fatty acids supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. **J. Nutr**., v. 121, p. 547-555, 1991.

MILLS, S. C.; WINDSOR, A. C.; KNITHG, S. C. The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes. *Clinical* **and Experimental Immunology**, v. 142, p. 216-228, 2005.

MIYAZAKI, T; KAIGE, N. Comparative hitopathology of edwarsiellosis in fishes. **Fish Pathology**, v. 20, p. 219-27, 1985.

MOCCIA, R.D.; HUNG,S.S.O.; SLINGER, S.J.; FERGUNSON, H.W. Effect of oxidized fish oil, vitamin E and ethoxyquin on the histopathology and hematology of raibow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Journal of fish diseases**. v. 7, p. 269-282, 1984.

MONTERO, D.; BLAZER, V. S.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M. S.; TORT, L. Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, v. 179, p. 523-534, 1999.

MONTERO, D., KALINOWSKI, T., OBACH, A., ROBAINA, L., TORT, L., CABALLERO, M. J., IZQUIERDO, M. S. Vegetable lipid sources for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): effects on fish health. **Aquaculture**, v. 225, p. 353-370, 2003.

MONTEIRO, D., TORT, L., IZQUERDO, M. S., ROBAINA, L., VERGARA, J. M. Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead sea bream caused by alpha-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. **Fish Physiology and Biochemistry** v. 18, p. 399-407, 1998.

MOURENT, G., GOOD, J. E. & Bell, J. G. Partial substitution of fish oil with rapessed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effets on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E_2 and $F_{2\propto}$, immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. **Aquaculture Nutrition**, v. 11, p. 25-40, 2005.

MUIR, J. *et al*. **Production in intensive and recycle systems**. In: Beveridge, M. C. M., Mc Andrews, B. J., Tilapias: Biology and Exploitation. Kluwer Academic Publishing, Great Britain, p. 405-445, 2000.

MUSTAFA, T.; SRIVASTAVA, K. C. Prostaglandins (eicosanoids) and their role in ectothermic organisms. **Adv. Comp. Environ. Physiol**., v. 5, p. 157-207, 1989.

NEW, M. B. **Feed and feeding of fish and shrimp**, 1987.

NG, W. K.; KOH, C. B., DIN, Z. B. Palm oil-laden spent bleaching clay as a substitute for marine fish oil in the diets of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture nutrition**, v. 12, p. 459-468, 2006.

National Research Council (NRC). **Nutrient Requiments of Domestic Animals. Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shellfishes**. National Academic Press, Washington, DC, 102p., 1993.

PABLO, M. A.; PUERTOLLANO, M. A.; CIENTIFUEGOS, G. V. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune functions. **Clin. Diagn. Lab. Immunol**., v. 9, p. 945-950, 2002.

PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BORDAT, C.; VIDAL, B. Demonstration of bone resorbing cells in elasmobranches: comparison with osteoclasts. **Tissue and Cell**, v. 21, n. 6, p. 925-933, 1989.

PETRIC, M.C. **Efeito da suplementação com vitamina C sobre a formação de gigantócitos em lamínulas de vidro implantadas no tecido subcutâneo de pacus (*Piaractus mesopotamicus* ,Holmberg, 1887)**. Departamento de Patologia Veterinária, FCAV-UNESP, Jaboticabal (Dissertação de Mestrado), 86p., 2000.

PETRIC, M.C.; MARTINS, M.L.; ONAKA, E.M.; MORAES, J.R.E.; MORAES, F.R.; MALHEIROS, E.B. Suplementação alimentar com vitamina C potencia a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n.1, p. 69-76, 2003a.

PETRIC, M.C.; MORAES, F.R.; MORAES, J.R.E. Polycarion macrophage formation kinetics in *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). Experimental model. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, n. 2, p. 95-100, 2003b.

PEZZATO, L. P., BARROS, M. M., FRACALOSSI, D. M., CYRINO, J. E. P.. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J. E. P., URBINATI, E. C., FRACALOSSI, D. M., CASTAGNOLLI, N.. 2004. **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. – São Paulo: TecArt 2004. p. 75-169, 2004.

POLVI, S. M.; ACKMAN, R. G. Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle lipids and their response to alternative fatty acid sources. **J. Agric. Food Chem**., v. 40, p. 1001-1007, 1992.

PULSFORD, A.; MATHEUS, R. A. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkil*. **Journal of Fish Disease**, v. 141, p. 67-78, 1991.

RAMAKRISHNA N. R.; BURT M. D. Tissue response of fish by larval *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda; Ascaridoidea). **Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture science**, v. 48, p. 1623-1628, 1991.

RODRIGUES, E. L.; MISSIMA, F.; AZEVEDO, T. D. **Análises hematológicas do sangue periférico de *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), mantidas em pesque-pague ao longo das estações do ano**. In: Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos 7 e Encontro Latino-americano de Patologistas de Organismos Aquáticos 3, Foz de Iguaçu, PR, 2002. Anais... p.41.

RYAN G. B.; SPECTOR W. G. Macrophage turnover in inflamed connective tissues. **Proceedings of the Royal Society of london** (B), v. 175, p. 269-292, 1970.

SAKAI, M. Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**, v. 172, p. 63-92, 1999.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. **The lipids**. In: Fish Nutrition, 3rd edn. (Halver, J. E., Hardy, R. W.eds) pp. 181-257. Elsevier, USA, 2002.

SARGENT, J. R., HENDERSON, R. J., TOCHER, D. R. **The lipids**. In: Fish Nutrition, (Halver, J. E. ed.), pp. 154-218. Academic Press, New York., USA, 1989.

SATOH, S.; POE, W, E.; WILSON, R. P. Effects of dietary n-3 fatty acids on weight gain and liver polar lipid fatty acid composition of fingerling channel catfish. **J. Nutr**., v. 119, p. 23-28, 1989a.

SATOH, S.; POE, W, E.; WILSON, R. P. Studies on the essential fatty acid requirement of channel catfish*, Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 79, p. 121-128, 1989b.

SECOMBES, C. J. The *in vitro* formulation of teleost multinucleate gigant cells. **J. Fish Dis**., v. 8, p. 461-464, 1985.

SECOMBES, C. J.; CLEMENTS, K.; ASHTON, I.; ROWLEY, A. F. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 42, p. 367-378, 1994.

SHELDON, W. M. Jr.; BLAZER, V. S. Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophage. **J. Aquat. Anim. Health**, v. 3, p. 87-93, 1991.

SIBAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995, 70p.

SITJA-BOBADILLA, A.; PEREZ-SANCHEZ, J. Diet related changes in non-specific immune response of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Fish Shellfish Immunol**., v. 9, p. 637-640, 1999.

STANKOVA, J.; ROLA-PLESZCZYNSKI, M. **Eicosanoids in defence**. In: Humoral Factor (Sim, E. ed.), pp. 319-335. IRL Press, Oxford, 1993.

STICKNEY, R. R.; WURTS, W. A. Growth response of blue tilapia to selected levels of dietary menhaden and catfish oil. **Prog. Fish-Cult**., v. 48, p. 107-109, 1986.

SUBHADRA, B.; LOCHMANN, R.; RAWLES, S.; CHEN, R. Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquaculture**, v. 255, p. 210-222, 2006.

TAKEUCHI, T.; WATANABE, T. Requirement of carp for essential fatty acids. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**., v. 43, p. 541-551, 1977.

TAKEUCHI, T.; SATOH, S.; WATANABE, T. Requirement of Tilapia nilotica for essential fatty acids. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish**., v. 49, p. 1127-1134, 1983.

TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F. R. Características hematológicas da Tilapia rendalli Boulenger, 1896 (osteichthyes: cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 19, p. 103-110, 2003.

TAVARES-DIAS, M. e MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. – Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 144p., 2004.

THOMPSON, K. D., TATNER, M. F., HENDERSON, R. J. Effects of dietary (n-3) and (n-6) polynsaturated fattty acid ratio on the immune response of Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. **Aquaculture Nutrition***,* v. 2, p. 21-31, 1996.

TIMUR, G.; TIMUR, M. Giant cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* in wild plaice, *Pleuronectes platessa*. **Journal of Fish Disease**, v. 7, p. 513-514, 1984.

TOCHER, D. R.; BELL, J. G.; DICK, J. R., HENDERSON, R. J.; MCGHEE, F.; MITCHELL, D. F.; MORRIS, P. C. Polyunsaturared fatty acid metabolism in Atlantic salmo (*Salmo salar*) undergoing parrsmolt transformation and the effects of dietary linseed and rapeseed oils. **Fish Physiol. Biochem**., v. 23, p. 59-73, 2000.

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

TORSTENSEN, B. E.; LIE, O.; FROYLAND, L. Lipid metabolism and tissue composition in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) effects of capelin oil, palm oil and oleic acid-enriched sunflower oil as dietary lipid sources. **Lipids***,* v. 35, p. 653-664, 2000.

TORT, L., GOMEZ, E., MONTERO, D. SUNYER, J. O. Serum haemolytic and agglutinating activity as indicators of fish immunocompetence: their suitability in stress and dietary studies. **Aquaculture International**, v. 4, p. 31-41, 1996.

UEDA, I. K.; EGAMI, M. I.; SASSO, W. S.; MATUSHIMA, E. R. Estudos hematológicos em Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, teleostei) – Parte I. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**., v. 34, p. 270-275, 1997.

UHING, R. J.; COWLEN, M. S.; ADAMS, D. O. Mechanisms regulating the production of arachidonate metabolites in mononuclear phagocytes. **Curr. Top. Membr. Transp**., v. 35, p. 349-374, 1990.

VILASECA, J.; SALAS, A.; GUARNER, F.; RODRIGUEZ, R.; MARTINEZ, M.; MALAGELADA, J. R. Dietary fish oil reduces progression of chronic inflammatory lesions in a rat model of granulomatous colitis. **Gut.**, v. 31, p. 539-544, 1990.

WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. Ligth microscopical observations of culture yellotail *Serola quinqueradiata,* characterized by yellow discoloration of body surface. **Fish Pathology**, v.24, p.211-218, 1989.

WADA, S.; HATAI, K.; KUBOTA, S. Histopathological study of culture striped jack with yellow fat disease. **Fish Pathology***,* v. 26, p.61-67, 1991.

WEBSTER, C. D.; LOVELL, R. T.; CLAWSON, J. A. Ratio of 20:3(n-9) to 20:5(n-3) in phospholipids as an indicator of dietary essential fatty acid sufficiency in striped bass,

Morone saxatilis, and *Palmetto bass*, *Morone saxatilis* x *Morone chryops*. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 4, n. 4, p. 75-90,1994.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal Fisheries Research Board of Canada**. v. 22, n. 5., 1970.

YAQOOB, P.; CALDER, P. C. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T-cell derived cytokines. ***Cytokine*,** v. 7, p. 548-557, 1995.

YAQOOB, P.; NEWSHOLME, E. A., CALDER, P. C. Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids. **Immunol, Lett**., v. 41, p. 241-247, 1994.