



ARIANE FRANCO

**EFEITO DAS RELAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DAS SÉRIES
n-6/n-3 EM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA
FÊMEAS E MACHOS EM REPRODUÇÃO DE TILÁPIAS
(*Oreochromis niloticus*)**

**LAVRAS - MG
2019**

ARIANE FRANCO

**EFEITO DAS RELAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DAS SÉRIES n-6/n-3 EM
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA FÊMEAS E MACHOS EM
REPRODUÇÃO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de Zootecnia,
para a obtenção do título de Bacharel.

Prof.^a Dr.^a Priscila Vieira Rosa

Orientadora

Dr.^a Tamira Maria Orlando

Coorientadora

LAVRAS - MG

2019

ARIANE FRANCO

**EFEITO DAS RELAÇÕES DE ÁCIDOS GRAXOS DAS SÉRIES n-6/n-3 EM
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS PARA FÊMEAS E MACHOS EM
REPRODUÇÃO DE TILÁPIAS (*Oreochromis niloticus*)**

Trabalho de conclusão de curso apresentado
à Universidade Federal de Lavras, como
parte das exigências do Curso de Zootecnia,
para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADO em 29 De Novembro de 2019

Prof^a Dr^a Priscila Vieira Rosa, UFLA

Dr^a Tamira Maria Orlando, UFLA

M^a Izabella Luiza Gomes Almeida, UFLA

Prof.^a Dr^a Priscila Vieira Rosa

Orientadora

**LAVRAS – MG
2019**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me guiado até aqui.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia (DZO), por todas as oportunidades oferecidas durante a graduação.

À minha orientadora, Prof.^a Priscila Vieira Rosa, por toda a confiança e orientação durante o trabalho.

À minha banca, Dr^a Tamira Maria Orlando e M^a Izabella Luiza Gomes Almeida, pela orientação fundamental na realização do trabalho e pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os professores que contribuíram para construção do meu conhecimento.

Ao PIBIC-UFLA pela bolsa de iniciação científica e apoio aos projetos de pesquisa.

Ao NAQUA, Núcleo de Estudos em Aquicultura, pelo aprendizado adquirido e por tornar a execução desse trabalho de pesquisa possível.

À minha família, minha mãe Margareth, meu pai Vicente e meus irmãos Marleyson e Ariadne pelo incentivo e pela força concedida nos momentos difíceis.

Ao meu namorado Ladislau pelo apoio, companheirismo e ajuda incondicional durante toda a graduação.

Aos amigos e colegas que sempre apoiaram e confiaram nos meus estudos.

Muito Obrigada!

RESUMO

O fornecimento de ácidos graxos das séries n-6 e n-3 é essencial para os animais, no entanto é importante garantir que a relação destes ácidos graxos seja adequada uma vez que compartilham enzimas em suas vias metabólicas, podendo favorecer ou inibir a síntese de determinados produtos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da relação de ácidos graxos n-6 e n-3 sobre a hematologia de fêmeas e machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em reprodução. Foram utilizados 72 peixes com peso inicial médio de 124,3 g, alimentados com 4 dietas experimentais, variando as relações de n-6/n-3 (20,1; 4,5; 3,9; 0,7). O sangue foi colhido por punção da veia caudal com seringa contendo EDTA e os números totais de trombócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos no sangue foram calculados pelo método indireto, a partir de extensões sanguíneas. Para fêmeas o tratamento 1 exibiu maior número de neutrófilos ($p < 0,05$), enquanto que nas dietas 3 e 4 observou-se maior número de trombócitos ($p < 0,05$). Para os machos o tratamento 2 diferiu do tratamento 3 em relação ao número de trombócitos ($p < 0,05$) e não houve diferenças significativas para as demais variáveis analisadas. Esses resultados indicam um efeito inflamatório dos ácidos graxos n-6 e anti-inflamatório dos ácidos graxos n-3.

Palavras chave: peixes, reprodutores, hematologia

SUMÁRIO

1. Introdução.....	7
2. Referencial Teórico	8
2.1. Lipídeos e Reprodução	8
2.2. Ácidos Graxos e Metabolismos de PUFA's	8
2.3. Utilização da hematologia	10
3. Material e Métodos.....	11
3.1. Localização e Condições Experimentais	11
3.2. Dietas experimentais	11
3.3. Coleta das amostras biológicas	13
3.4. Análises hematológicas.....	13
3.5. Preparação das extensões sanguíneas	14
3.6. Métodos de contagem de células sanguíneas.....	14
3.7. Contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer	14
3.8. Contagem total de leucócitos e trombócitos	15
3.9. Contagem diferencial de leucócitos	15
3.8. Análise estatística	16
4. Resultados	16
5. Discussão.....	18
6. Conclusão	19
7. Referências Bibliográficas	20

1. Introdução

A nutrição tem um papel importante na piscicultura, visto que 70% dos custos de produção se devem aos gastos com ração. Nutrição sempre será o gargalo da aquicultura no Brasil e no mundo. Os principais pontos críticos da nutrição de peixes incluem o conhecimento das exigências nutricionais, da composição dos alimentos e o consumo de ração.

Sabe-se que as exigências nutricionais dos reprodutores não são os mesmos daqueles determinados para as fases iniciais do desenvolvimento, o conhecimento da influência da dieta sobre o desempenho reprodutivo torna-se uma ferramenta indispensável para a elaboração de dietas adequadas principalmente no início do desenvolvimento gonadal e no período da vitelogênese.

Devido ao aumento da demanda de alimento, é importante que se encontrem formas de melhorar a nutrição de reprodutores de peixes para conseguir larvas, ovos e maiores índices reprodutivos e, com isso, aumentar a produção e disponibilização de alevinos.

O metabolismo lipídico talvez seja o mais estudado dentro da nutrição, no entanto, continua sendo o menos compreendido, apesar dos esforços em pesquisa direcionados ao estudo desse nutriente na aquicultura (SARGENT et al., 1999a; SARGENT; TOCHER; BELL, 2002). No entanto, existe consenso quanto à importância de alguns ácidos graxos para o crescimento, sobrevivência e saúde dos peixes.

A relação entre a nutrição e a imunologia tornou-se assunto relevante nos últimos anos. Os ácidos graxos têm ganhado bastante espaço nessa discussão uma vez que diversas pesquisas têm demonstrado um potencial imunoregulatório de ácidos graxos poli-insaturados das famílias n-6 e n-3 (CALDER, 2007).

Ácidos graxos essenciais (AGE) são exigidos em dietas de peixes para o crescimento, sobrevivência, reprodução, constituição e manutenção de membranas, coagulação sanguínea e resposta imune. Os ácidos graxos altamente insaturados das famílias ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3) têm sido relacionados ao sucesso reprodutivo dos peixes de diferentes espécies, porém, ainda se sabe muito pouco sobre as rotas pelas quais esses ácidos atuam.

Diante disto, pesquisas voltadas para análises hematológicas tem se tornado importantes ferramentas para avaliar o estado de saúde dos peixes e auxiliar na busca por avanços tecnológicos que sirvam de base para o crescimento e fortalecimento da produção piscícola. Com isso o avanço tecnológico na nutrição de reprodutores é de grande

importância, a fim de garantir maior produção de gametas, e maior desenvolvimento de larvas e alevinos que é uma das principais dificuldades para o desenvolvimento desse setor.

Portanto, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da relação de ácidos graxos n-6 e n-3 sobre a hematologia de fêmeas e machos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em reprodução.

2. Referencial Teórico

2.1. Lipídeos e Reprodução

A importância dos lipídeos na reprodução dos peixes cultivados ainda é pouco compreendida. No entanto, sabe-se que os requerimentos nutricionais das matrizes não são os mesmos daqueles determinados para as fases iniciais do desenvolvimento.

Também se pode afirmar que, como nos demais animais, diversos dos problemas encontrados nas fases iniciais do cultivo estão diretamente relacionados com a nutrição das matrizes (IZQUIERDO; FERNANDEZ-PALACIOS; TACON, 2001).

A deposição de ácidos graxos, especialmente os HUFAs (ácidos graxos poli-insaturados), nas gônadas de peixe em preparação para a reprodução, mesmo quando estes ácidos se encontram deficientes na dieta, também é um indicativo da importância destes nutrientes para o processo reprodutivo (HAREL et al., 1994).

Existem diversos relatos que comprovam uma ação reguladora dos ácidos graxos da dieta das matrizes sobre a taxa de fertilização, taxa de eclosão, maturação dos oócitos e qualidade das larvas (BELL; SARGENT, 2003; JOHNSON, 2009; PATINO et al., 2003; SALZE et al., 2005; SORBERA et al., 2001).

2.2. Ácidos Graxos e Metabolismos de PUFA's

Após os processos de digestão de lipídios, os ácidos graxos essenciais tem seu metabolismo realizado no fígado de onde são transportados em forma de lipoproteínas de muita baixa densidade (WAITZBERG, 2012) para realizarem suas funções fisiológicas e incorporação na membrana plasmática celular.

Os peixes, assim como os demais vertebrados são capazes de metabolizar o ácido linoleico e o ácido linolênico através da ação de enzimas dessaturases e elongases que geram PUFA's capazes de se acoplar nas membranas plasmáticas das células (SARGENT et al., 2002). A incorporação desses ácidos graxos nas membranas fosfolipídicas gera mudanças

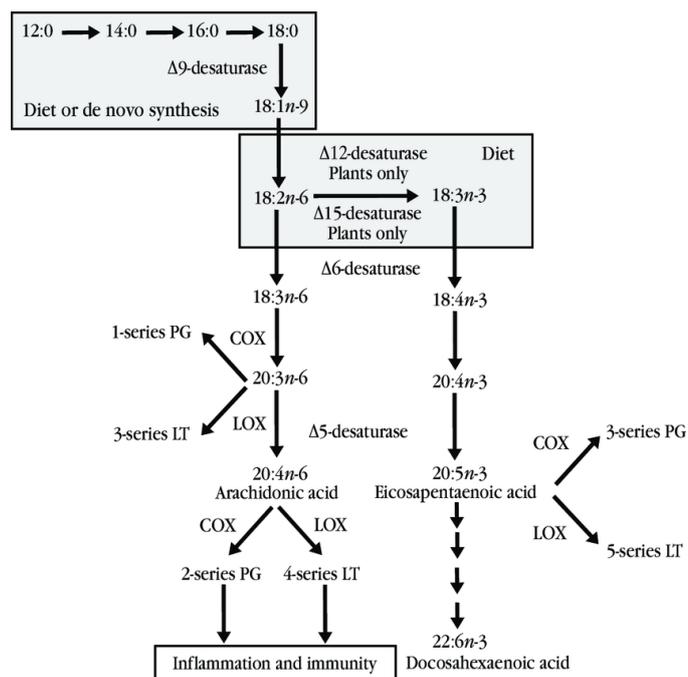
estruturais e funcionais influenciando em processos importantes, como a produção de mediadores inflamatórios (CALDER, 2008).

Os ácidos graxos, linoleico (18:2 n-6) e linolênico (18:3 n-3), são nutricionalmente essenciais para os peixes de água doce, e estes podem ser bioconvertidos em PUFAs de cadeia longa (LC-PUFAs) (OLSEN et al., 1990; TOCHER, 2010). Os LC-PUFAs, ácido araquidônico (ARA, 20:4 n-6), ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 n-3) e ácido docosahexanóico (DHA, 22:6 n-3), tem importante papel na resposta imune e inflamatória, sendo o ARA o principal deles (TOCHER, 2003; MONROIG et al., 2018).

O ARA, gera numerosos eicosanoides pró-inflamatórios, prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXs) da série 2 e leucotrienos (LTs) da série 4 (SCHMITZ E ECKER, 2008; YATES et al., 2014). Ambas as séries 2 e 4 são mediadores de alta bioatividade na condição de inflamação (ARIEL, 2007). Por outro lado, o EPA serve como substrato para a produção de PGs e TXs da série 3 e LTs da série 5, que possuem efeitos pró-inflamatórios relativamente mais baixos (CALDER, 2007).

EPA e DHA ainda biosintetizam os mediadores pró-resolutivos (YATES et al., 2014; SERHAN et al., 2017). Estes geralmente são considerados anti-inflamatórios, por promoverem a resolução da resposta inflamatória e retorno à homeostase (CALDER, 2015; SERHAN et al., 2018).

Figura 1. Biossíntese e Metabolismo de Ácidos Graxos Poli Insaturados



Fonte: Calder, (2002a)

2.3. Utilização da hematologia

A realização de exames hematológicos é uma forma de avaliar o estado de saúde dos peixes, tornando-se um precioso instrumento para o conhecimento das alterações fisiológicas que ocorrem durante o cultivo (HIGUCHI et al., 2011). Porém novos estudos precisam ser conduzidos com a finalidade de aumentar as áreas em que esta pode ser útil (FELDMAN et al., 2006).

A hematologia não está presa apenas aos diagnósticos de estados patológicos, mas também pode inferir sobre o estado nutricional dos peixes. Além de nutrir um animal a fim de obter dele seu melhor desempenho produtivo, é preciso também nutrir seu sistema de defesa (BARROS et al., 2009).

Fatores ambientais e biológicos influenciam na homeostase e na composição bioquímica do plasma sanguíneo o qual, conseqüentemente, reflete a condição metabólica do organismo do animal perante alguma alteração de nível fisiológico ou nutricional. (SHERIDAN & MOMMSEN, 1991).

O nível de estresse o qual um animal é exposto pode ser visivelmente quantificado por análises hematológicas, podendo influenciar no aumento da produção de eritrócitos em órgãos como baço e rim, porém a deficiência de alguns fatores nutricionais como vitaminas, por exemplo, a vitamina B6, são desencadeadores de reações que diminuem a produção de eritrócitos, leucócitos e também trombócitos. (TAVARES-DIAS & MORAES, 2004).

Dentro das análises hematológicas, o hemograma é um recurso importante para a quantificação e diferenciação das diversas células sanguíneas. O leucograma está ligado a contagens absolutas e relativas do número de leucócitos presentes nos sangue e o trombograma está designado a quantificar o número de trombócitos circulantes na corrente sanguínea.

Portanto, torna-se importante fazer um estudo hematológico para se desenvolver a percepção dos parâmetros de normalidade e patogenia dentro de uma espécie, assim pode-se trabalhar na identificação de fatores desfavoráveis a manter a homeostasia do organismo do animal (TAVARES-DIAS et al. 1999).

3. Material e Métodos

3.1. Localização e Condições Experimentais

O experimento foi realizado na Estação de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras, em laboratório com recirculação de água. Um total de 96 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem UFLA foram distribuídos em caixas de fibra de vidro de 250 litros. O laboratório experimental é provido de filtros de areia, filtro ultravioleta, filtro biológico e sistema de controle da temperatura, constantes. O fluxo de água nas caixas experimentais é suficiente para três renovações completas de água por hora.

Durante todo o período experimental, a qualidade da água foi monitorada diariamente e mantida dentro das condições ótimas para a tilápia. A medição do pH foi realizada com um pHmetro digital, portátil, (Bernauer, F-1005). O oxigênio foi medido com um oxímetro digital portátil (Bernauer, F-1550A) e a temperatura monitorada por uma sonda pt 100, ligada a um controlador de temperatura (N540) do próprio sistema de recirculação dos laboratórios, mantendo a temperatura da água à 28°C.

3.2. Dietas experimentais

Os peixes foram alimentados em horários fixos duas vezes ao dia (08:00 h e 14:00 h) até saciedade aparente e as sobras coletadas e mensuradas para determinação do consumo. Diariamente foram realizadas a sifonagem dos tanques para retirada de excretas não carregadas pelo sistema.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC) com três repetições, totalizando 12 parcelas. Cada parcela foi constituída por 6 fêmeas (peso inicial médio de 124,5g) e 2 machos (peso inicial médio de 131,3g) em uma relação macho/ fêmea de 1/ 3, como recomendado por LITTLE & HULATA, 2000. Durante o período experimental, que durou 105 dias, os peixes foram alimentados com 4 dietas experimentais, formuladas para conterem diferentes relações n-6/n-3, obtidas a partir dos óleos de milho e de linhaça, ricos em ácido linoleico e ácido linolênico, respectivamente (20,1; 4,5; 3,9 e 0,7).

A composição dos ingredientes das dietas e a composição proximal calculada das dietas experimentais são mostradas na Tabela 1 e a composição de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) das dietas na Tabela 2.

Tabela 1. Ingredientes e composição proximal das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Dietas			
	20,1	4,5	3,9	0,7
Proteína texturizada de soja	55,00	55,00	55,00	55,00
Farinha de peixe	8,00	8,00	8,00	8,00
Amido de milho	17,00	17,00	17,00	17,00
Gelatina	5,74	5,74	5,74	5,74
Celulose	2,21	2,21	2,21	2,21
Óleo de milho	3,00	2,01	1,02	0,00
Óleo de linhaça	0,00	0,99	1,98	3,00
Óleo de palma	4,00	4,00	4,00	4,00
Fosfato bicálcico	1,50	1,50	1,50	1,50
Caulim	2,18	2,18	2,18	2,18
Cloreto de sódio	0,5	0,5	0,5	0,5
Mix vitamínico e mineral	0,5	0,5	0,5	0,5
DL-Metionina	0,19	0,19	0,19	0,19
Treonina	0,1	0,1	0,1	0,1
Vitamina C	0,06	0,06	0,06	0,06
Antioxidante BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição proximal (% peso seco)				
Matéria seca	90,87	93,51	94,47	93,16
Proteína bruta	38,0	38,0	38,0	38,0
Extrato etéreo	7,74	7,74	7,74	7,74
Cinzas	9,5	9,3	9,2	9,9
Energia (Kcal/ Kg)	3997,5	3997,5	3997,5	3997,5

^aProteína bruta 50%, Extrato etéreo 1.3%.

^bNutrimix, MS, Brazil Mix vita/min peixes onívoros Cargill, SP, Brazil.

^cComposição (mg kg⁻¹ dieta): sulfato de ferro, 196; sulfato de cobre, 28; óxido de zinco, 280; óxido de manganês, 52; selenito de sódio, 1.2; sulfato de cobalto, 0.4; iodeto de potássio 1.2; vitamina A, 19,950 (UI kg⁻¹ dieta); vitamina D3, 7980 (UIkg⁻¹dieta); vitamina E, 199; vitamina K3, 10; vitamina C, 700; tiamina, 50; riboflavina,50; piridoxina, 50; cianocobalamina, 0.1; niacina, 200; pantotenato de cálcio,100; ácido fólico, 10; biotina, 1.6; inositol, 100; etoiquina, 247. d Valores calculados.

Tabela 2. Composição de ácidos graxos (% do total de ácidos graxos) das dietas experimentais.

Ácidos graxos	Relação n-6/ n-3 dietéticos			
	20,1	4,5	3,9	0,7
C14:0	7,06	0,7	7,7	7,7
C16:0	18,3	27,2	12,7	10,5
C16:1	0,5	0,6	0,7	0,6
C17:0	0,0	0,1	0,1	0,1
C18:0	3,3	4,2	3,5	4,3
C18:1 n9	25,4	34,5	22,7	21,0
C18:2 n6	26,7	24,1	23,2	13,6
C18:3 n3	1,3	5,4	5,9	18,4
C20:0	0,3	0,4	0,2	0,1
C20:1 n9	0,3	0,3	0,3	0,3
C20:2	0,1	0,1	0,1	0,1
C20:4 n6	0,1	0,1	0,2	0,1
C20:5 n3	0,6	0,5	0,5	0,5
C22:0	0,1	0,0	0,0	0,1
C22:6 n3	0,7	0,7	0,8	0,6
Σ SAFA	29,0	32,7	24,2	22,9
Σ MUFA	26,2	35,4	23,8	22,0
Σ PUFA	29,3	31,3	30,3	33,4
Σ LC-PUFA	1,4	1,3	1,6	1,3
Σ n-6	26,7	24,2	23,4	13,7
Σ n-3	2,6	6,5	7,4	19,6
LA/LNA	20,1	4,5	3,9	0,7
ARA/ EPA	0,2	0,3	0,3	0,2

Σ SAFA: somatório de ácidos graxos saturados; Σ MUFA: somatório de ácidos graxos monoinsaturados;

Σ PUFA: somatório de ácidos graxos poliinsaturados; LC-PUFA: somatório de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa.

3.3. Coleta das amostras biológicas

Após o período experimental, os animais foram anestesiados por meio de uma solução de benzocaína (p-aminobenzoato de etila) na concentração 200 mg L⁻¹ e foram coletadas amostras de sangue para quantificação das análises hematológicas.

3.4. Análises hematológicas

As amostras de sangue foram coletadas a partir de punção da veia caudal usando seringas contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 10%. Uma alíquota do sangue foi utilizada para contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer e para a contagem total e diferencial de leucócitos e trombócitos (RANZANI-PAIVA et al., 2013) em

lâminas coradas segundo método de Rosenfeld, 1947, obtendo-se um hemograma de cada animal.

Para a realização do hemograma e do leucograma, quantificou-se o número de células sanguíneas pelo método indireto a partir das extensões sanguíneas, conforme Martins et al. (2004). A contagem total de eritrócitos foi realizada em câmara de Neubauer, após a diluição de 1:200 em solução de cloreto de sódio (0,65%) e a identificação dos tipos de leucócitos se deu por contagem diferencial perante distinção morfofisiológica dessas células.

3.5. Preparação das extensões sanguíneas

As lâminas foram previamente banhadas em solução de metanol, o qual permitiu uma melhor aderência do esfregaço sanguíneo a lâmina, com o auxílio de uma pipeta automática e 5µL de sangue foi colocado em uma das extremidades da lâmina e em seguida espalhado uniformemente por toda esta, executando-se então a extensão sanguínea.

As extensões foram feitas em duplicatas e coradas pelo método May-Grunwald Giemsa (ROSENFELD, 1947) com a finalidade de evidenciar as células sanguíneas e posteriormente realizar a contagem diferencial de leucócitos e a contagem total de trombócitos e leucócitos.

3.6. Métodos de contagem de células sanguíneas

Os métodos utilizados em hematologia clínica de mamíferos não se aplicam a hematologia de peixes. Isto se dá pelo fato de peixes possuírem eritrócitos nucleados o que causaria confusão perante as demais células sanguíneas. Em vista disto, utilizou-se de métodos indiretos para a contagem de leucócitos e trombócitos, tomando-se como base os valores de contagens de eritrócitos a partir da câmara de Neubauer, em associação com o número de leucócitos e trombócitos encontrados nas extensões sanguíneas (PITOMBEIRA; MARTINS, 1966; HRUBEC; SMITH, 1998).

3.7. Contagem de eritrócitos em câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer foi utilizada na contagem visual de eritrócitos. Esta câmara consiste em uma lâmina de vidro espesso e retangular, a qual possui dois retículos na porção central separados por sulcos laterais. O retículo, na câmara de Neubauer, é um quadrado dividido em nove áreas, as áreas laterais são redivididas em 16 quadrículos e a área central em 25 quadrículos.

Para o início do procedimento, preparou-se solução salina 0,65% (NaCl) homogeneizada e autoclavada na qual a amostra sanguínea foi diluída. Diluiu-se então, com o auxílio de uma pipeta automática, 10 µL de sangue em 1990 µL de solução salina, obtendo-se uma proporção de diluição de 1:200. Posteriormente, adicionou-se uma alíquota da solução de sangue na câmara até seu preenchimento, aguardaram-se alguns segundos para a decantação dos componentes sanguíneos e então a câmara foi levada ao microscópio para se visualizar a distribuição das células, sob objetiva de 400x. Neste momento, visualizada uma correta distribuição das células, fez-se a contagem das células em 5 quadrados pequenos do retículo.

O cálculo final para o número de eritrócitos foi feito a partir da fórmula: Número de eritrócitos µL⁻¹ de sangue = número de glóbulos contados x diluição (200) x altura entre lamínula e câmara (10) x 5 (número de quadrados contados).

3.8. Contagem total de leucócitos e trombócitos

O método para a contagem total de leucócitos e trombócitos utilizado foi o método de contagem indireta a partir de extensões sanguíneas coradas. Este método baseia-se na relação eritrócitos/leucócitos, sendo este contado nas extensões e aquele na câmara de Neubauer.

Primeiramente, contou-se na extensão corada a quantidade de 2.000 células sanguíneas sem diferenciação, sendo elas eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Foram anotados separadamente o número de leucócitos e trombócitos encontrados por lâmina. Após isso, para se estimar o número total de leucócitos e trombócitos, lançou-se mão de uma regra de três em que levou em consideração o número de células encontradas na contagem feita na câmara de Neubauer.

A relação utilizada foi a de que as 2.000 células contadas estavam para o número de leucócitos ou trombócitos encontrados por extensão enquanto o número de células na câmara de Neubauer estava para o valor total de leucócitos ou trombócitos a ser encontrado e por µL de sangue (PITOMBEIRA; MARTINS, 1966; HRUBEC; SMITH, 1998).

3.9. Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial leucocitária foi feita para determinar a proporção existente entre as variedades de leucócitos existentes no sangue. No presente trabalho foram levados em consideração apenas os linfócitos, monócitos e neutrófilos presentes no sangue dos

animais experimentais. A contagem foi feita cautelosamente com auxílio de materiais que ajudassem na correta identificação das células, impedindo possíveis erros.

A técnica utilizada baseou-se em identificar no decorrer da extensão sanguínea, 200 leucócitos das classes citadas acima, em vista dos leucócitos não se distribuírem uniformemente a contagem foi feita em “zig-zag” percorrendo a maior área possível da extensão.

O cálculo do número total de leucócitos foi dado em porcentagem perante a totalidade de 200. Então, utilizando-se do valor de leucócitos totais encontrado na contagem total de leucócitos, pode-se encontrar a quantidade de cada classe leucocitária diferenciada. Isto se deu por uso de uma regra de três simples na qual o valor de leucócitos totais em μL encontrado representava 100% dos leucócitos, enquanto a porcentagem encontrada para cada tipo de leucócito estaria para o valor em μL a ser encontrado para este tipo de leucócito. Este procedimento foi feito para as cinco classes leucocitárias de interesse e a soma final de cada uma delas deveria, por lógica, representar o valor de leucócitos totais.

3.8. Análise estatística

Foram realizadas as análises de normalidade e homogeneidade das variâncias, pelos testes de Shapiro Wilk e Levene, respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas entre as médias foram determinadas utilizando-se o teste de Tukey. Uma probabilidade de 5% foi usada para rejeitar a hipótese nula. As análises estatísticas foram feitas pelo software IBM SPSS para Windows, versão 23,4. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média.

4. Resultados

A seguir estão representados os valores de trombograma e leucograma, especificando as porcentagens encontradas de três tipos de leucócitos: linfócitos, neutrófilos e monócitos em fêmeas (Tabela 3) e machos (Tabela 4), respectivamente.

Tabela 3. Contagem total de trombócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos no sangue de fêmeas reprodutoras de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes proporções de ácidos graxos n-3 e n-6.

	Diets				EPM
	20,1	4,5	3,9	0,7	
Trombócitos (%)	5,4 ^a	7,9 ^a	21,8 ^b	26,5 ^b	1,7
Linfócitos (%)	89,3	90,5	90,1	89,6	0,3
Neutrófilos (%)	8,0 ^b	6,1 ^a	5,6 ^a	5,6 ^a	0,2
Monócitos (%)	2,1	2,9	2,5	3,2	0,2

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados das análises hematológicas obtidas a partir do sangue das fêmeas mostram resultados significativos dos tratamentos sobre os trombócitos, células sanguíneas de peixes que auxiliam no processo de coagulação sanguínea e neutrófilos, células envolvidas no processo inflamatório (p<0,05).

Os tratamentos 1 exibiu maior número de neutrófilos (p<0,05), enquanto que nos tratamentos 3 e 4 observou-se maior número de trombócitos (p<0,05) (Tabela 3).

Para as demais variáveis, linfócitos e monócitos, não foram observados efeito significativo (p>0,05) das dietas (Tabela 3).

Tabela 4. Contagem total de trombócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos no sangue de machos reprodutores de tilápias (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes proporções de ácidos graxos n-3 e n-6.

	Diets				EPM
	20,1	4,5	3,9	0,7	
Trombócitos (%)	0,58 ^{ab}	0,48 ^a	1,23 ^b	1,04 ^{ab}	0,45
Linfócitos (%)	82,75	87,12	86,33	81,67	84,03
Neutrófilos (%)	13,12	12,12	10,67	15,00	1,24
Monócitos (%)	3,13	0,63	1,50	2,08	1,88

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças estatísticas significativas no teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados das análises realizadas com o sangue dos machos apresentaram resultados significativos apenas para trombócitos (p<0,05). O tratamento 3, com a relação 3,9:1,

apresentou um maior número de trombócitos com relação ao tratamento 2, relação 4,5:1, e os demais tratamentos foram intermediárias à esses ($p < 0,05$).

5. Discussão

Os eicosanoides produzidos a partir do metabolismo dos LC-PUFAs são mediadores inflamatórios lipídicos de ação rápida e com curta meia vida, diante disso, o presente estudo utilizou a hematologia como ferramenta indireta de dosagem da ação desses mediadores buscando através do hemograma e leucograma perfis resposta para a ação desses eicosanoides perante as células do sistema imune.

Os ácidos graxos obtidos dos óleos utilizados nas dietas passam por reações bioquímicas nas membranas fosfolipídicas das células e liberam poderosos precursores de eicosanoides como o ácido araquidônico (AA) e o ácido eicosapentaenóico (EPA). A metabolização desses precursores está restrita a duas rotas bioquímicas principais: cicloxigenase, da qual o AA tem maior preferência de metabolização, e lipoxigenase, rota preferencial do EPA (PERINI et al., 2010). Os produtos dessas rotas são mediadores imunológicos que atuam de diferentes maneiras no processo inflamatório determinando sua severidade.

Por compartilharem das mesmas rotas bioquímicas, a quantidade desses precursores no organismo é essencial para definir qual será a intensidade da resposta inflamatória. A ingestão excessiva de ácidos graxos de uma série, n-3 ou n-6, pode inibir a dessaturação de quantidades menores de um ácido graxo de outra série, fazendo com que a proporção de ingestão de n-3 e n-6 seja importante.

As dietas com fonte de ácidos graxos da série n-3, proporcionaram maiores quantidades de trombócitos, nos reprodutores. Ácidos graxos da série n-3 geram EPA e esse, por sua vez, é precursor de tromboxanos que têm funções pró-trombóticas (ANDRADE & TAVARES, 2006; CALDER, 2009).

Em relação ao trombograma, os valores encontrados para o total de trombócitos são correspondentes a aqueles ditos por Tavares-dias et al (2003). Os trombócitos são células semelhantes em função às plaquetas encontradas na circulação sanguínea de mamíferos, ambas atuam na coagulação sanguínea, entretanto, os trombócitos de peixes são células completas, isto é, há a presença de um núcleo o que os diferencia das plaquetas estruturalmente (FISCHER et al., 1998).

Quanto ao leucograma, houve algum fator que o tornou incompatível aos padrões de normalidade de *Oreochromis niloticus* apresentando valores altos do que o esperado. A causa para essa disfunção pode ser explicada pelo fato de as fêmeas estarem em fase reprodutiva (RANZANI-PAIVA et al. 2004), ou até por questões de estresse proporcionados pelo manejo executado com as mesmas (BARTON et al. 2002).

Estudos de Li et al. (2013), avaliando a influência dos ácidos graxos n-6 e n-3 na dieta de híbrido de tilápia (*O. niloticus* × *O. aureus*), não encontraram diferenças significativas na contagem total de leucócitos. Mourente et al. (2005) observaram diminuição significativa no número de leucócitos circulantes em *European seabass* (*Dicentrarchus labrax* L.) alimentados com óleo de linhaça, oliva e girassol em comparação aos que receberam dieta contendo óleo de peixe.

O número de linfócitos, neutrófilos e monócitos encontrados nesta pesquisa condizem com o dito por Azevedo et al (2006) em seu estudo sobre hematologia de *Oreochromis niloticus* fazendo uma comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague.

Assim como os monócitos, os neutrófilos também são capazes de realizar a migração inter-tecidual, chamada de diapedese. Estas células leucocitárias são muito importantes nos processos de inflamações e fagocitose (VALE et al.,2002). Os valores de neutrófilos encontrados também condizem com o trabalho de Tavares-dias et al (2000).

6. Conclusão

A relação dietética de ácidos graxos essenciais n-6 e n-3 e a incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados nas membranas das células imunes é importante e influencia os parâmetros hematológicos de reprodutores de tilápia do Nilo.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, P.M.M.; TAVARES, M.G.C. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoide, inflamação e imunidade. **Mn- Metabólica**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 135-143, 2006.
- ARIEL, A.; SERHAN, C. N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 4, p. 176–183, 2007.
- AZEVEDO, T.M.P.; MARTINS, M.L.; YAMASHITA, M.M.; FRANCISCO, C.J. Hematologia de *Oreochromis niloticus*: comparação entre peixes mantidos em piscicultura consorciada com suínos e em pesque-pague no Vale do rio Tijucas, Santa Catarina, Brasil. **Boletim Instituto da Pesca**, v. 32, n. 1, p. 41-49, 2006.
- BARROS, M.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; PEZZATO, L.E.; FALCON, D.R.; GUIMARÃES, I.G. Haematological response and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed diets containing folic acid. **Aquaculture Research**, v. 40, p. 895-903, 2009.
- BARTON, B.; MORGAN, J. D.; VIJAYAN, M. Physiological and Condition-Related Indicators of Environmental Stress in Fish. **Cap 4 Environmental Stress in Fish**, p. 111-148, 2002.
- BELL, J. G.; SARGENT, J. R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, n. 1/4, p. 491-499, Mar. 2003.
- CALDER, P. C.; GRIMBLE, R. F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. 14-19, 2002a.
- CALDER, P. C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 5–6, p. 327–335, 2007.
- CALDER, P. C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, n. 3–5, p. 101–108, 2008.
- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. **Biochimie**, Southampton, UK, v. 91. p. 791-795, 2009.
- CALDER, P.C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, p. 469-484, 2015
- DALLI, J.; COLAS, R.A.; SERHAN, C.N. Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. **Scientific reports**, n. 3, p. 1940-1940, 2013
- FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, C.N. Schalm's veterinary hematology. 5. ed. **Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins**, p. 1344, 2006.
- FISHER, U.; OTOTAKE, M. & NAKANISHI, T. Life span of circulating blood cells in ginbuna crucian carp (*Carassius auratus langsdorffii*). **Fish & Shellfish Immunol**, n. 8, p. 339-349, 1998.

- HAREL, M. et al. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead sea bream *S. aurata* females and subsequent effects on egg composition and egg quality. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 72, n. 1, p. 45-58, Jan. 1994.
- HIGUCHI, L.H.; FEIDEN, A.; MALUF, M.L.F.; DALLAGNOL, J.M.; ZAMINHAN, M.; BOSCOLO, W.R.; Avaliação eritrocitária e bioquímica de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos a dietas com diferentes níveis proteicos e energéticos. **Ciências Animal Brasileira**, v. 12, n. 1, p. 70-75, 2011.
- HRUBEC, T.C.; SMITH, S.A. Hematology of fishes. In.: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, M.C. Eds. **Schlam's Veterinary Hematology**. 5. ed. **Blackburg: Wiley-Blackwell**, p. 1120-1125, 1998
- IZQUIERDO, M. S.; FERNÁNDEZ-PALÁCIO, H.; TACON, A.G.J. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 25-42, 2001.
- JOHNSON, R. B. Lipid deposition in oocytes of teleost fish during secondary oocyte growth. **Reviews in Fisheries Science**, Tokyo, v. 17, n. 1, p. 78-89, Feb. 2009.
- LI, E.; LIM, C.; KLESIUS, P.H.; WELKER, T.L. Growth, Body Fatty Acid Composition, Immune Response, and Resistance to *Streptococcus iniae* of Hybrid Tilapia, *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*, Fed Diets Containing Various Levels of Linoleic and Linolenic Acids. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 44, n. 1, p. 42-55, 2013.
- LITTLE, D.C.; HULATA, G. Strategies for tilapia seed production. In: BEVERIDGE, M.C.M.; MCANDREW, B.J. (Eds.). *Tilapia: biology and exploitation*. **Dordrecht: Kluwer Academic Publisher**, p. 226-326, 2000.
- MARTINS, M. L.; PILARSKY, F.; ONAKA, E. M.; NOMURA, D. T.; FENERICK Jr., J.; RIBEIRO, K.; MYIAZAKI, D. M. Y.; CASTRO, M. P.; MALHEIROS, E. B. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 30, n. 1, p. 71-80, 2004.
- MONROIG, O., TOCHER, D.R., CASTRO, L.F.C. Chapter 3 - Polyunsaturated Fatty Acid Biosynthesis and Metabolism in Fish. in: Burdge, G.C. (Ed.), *Polyunsaturated Fatty Acid Metabolism*. **AOCS Press**, p. 31-60, 2018.
- MOURENTE, G.; GOOD, J.E.; BELL, J.G. Partial substitution of fish oil with rapeseed, linseed and olive oils in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): effects on flesh fatty acid composition, plasma prostaglandins E2 and F2 α , immune function and effectiveness of a fish oil finishing diet. **Aquaculture Nutrition**, v.11, n.1, p.25- 40, 2005.
- OLSEN, R.E.; HENDERSON, R.J.; MCANDREW, B.J. The conversion of linoleic acid and linolenic acid to longer chain polyunsaturated fatty acids by Tilapia (*Oreochromis*) nilotica in vivo. **Fish Physiol Biochem**, n. 8, p. 261-270, 1990.
- PATINO, R. et al. Role of arachidonic acid and protein kinase C during maturation-inducing hormone-dependent meiotic resumption and ovulation in ovarian follicles of Atlantic croaker. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 68, n. 2, p. 516-523, Feb. 2003.

PERINI, J.A.L.; STEVANATO, F.B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J.E.L.; DALALIO, M.M.O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V., Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PITOMBEIRA, M.S.; MARTINS, J.M. A direct method for White blood cell count in fishes. **Arquivos da Estação de Biologia Marinha da Universidade Federal do Ceará**, v. 6, n. 2, p. 605, 1966.

RANG, H.P.; DALE, M.M. **Farmacologia**, Ed Campus. 7 edição, p. 208 - 220, 2012.

RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. Sanidade de organismos aquáticos. In. RANZANI-PAIVA, M.J.T.; SILVA-SOUZA, A.T., **Hematologia de peixes brasileiros**. São Paulo: Varela, 2004.

RANZANI-PAIVA, M.J.; DE PÁDUA, S.B.; TAVARES-DIAS, M.; EGAMI, M. Métodos para análises hematológicas em peixes. 1. ed. Maringá: **Eduem**, p. 140, 2013.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May- Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-334, 1947.

SALZE, G. et al. Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. **Aquaculture Research**, Oxford, v. 36, n. 15, p. 1488-1499, Nov. 2005.

SARGENT, J. R.; MCCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 155, n. 1/4, p. 117-127, Sept. 1997.

SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish nutrition**. San Diego: Elsevier Science, p. 181-257, 2002.

SARGENT, J. R. et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, n. 1/4, p. 217-229, Sept. 1999a.

SCHMITZ, G.; ECKER, J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. **Progress in Lipid Research**, v. 47, p. 147-155, 2008.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; DALLI, J. New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 64, p. 1-17, 2018.

SHERIDAN, M. A.; MOMMSEN, T. P. Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 81, p. 473-483, 1991.

SIMÕES, M.R.; RIBEIRO, C. de F.A.; RIBEIRO, S. da C.A.; PARK, K.J.; MURR, F.E.X. Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 608- 613, 2007.

SORBERA, L. A. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 382-389, Jan. 2001.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; SILVA, E.D.; MORAES, F.R.; PERECIN, D. 1999 Hematologia de teleósteos brasileiros com infecção parasitária. I. Variáveis do *Leporinus macrocephalus* Garavelo e Britski, (Anostomidae) e *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Characidae). **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 337-342, 1988.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.C.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R. Características hematológicas de *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes : Cichlidae) cultivadas intensivamente em “pesque-pague” do município de Franca, São Paulo, Brasil. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 16, n. 2, p. 76-82, 2000b.

TAVARES-DIAS, M.; SCHALCH, S.H.; MORAES, F.R. hematological characteristics of brazilian teleosts. VII. Parameters of seven species collected in Guariba, São Paulo state, Brazil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 109-115, 2003.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; **Hematologia de Peixes Teleósteos**. Ribeirão Preto: M.Tavares-Dias, p. 144, 2004.

TOCHER, D.R. Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. **Reviews in Fisheries Science**, n. 11, p. 107-184, 2003.

TOCHER, D.R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, p. 717-732, 2010.

VALE, A.; AFONSO, A. & SILVA, M.T. The professional phagocytes of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): cytochemical characterisation of neutrophils and macrophages in the normal and inflamed peritoneal cavity; **Fish Shellfish & Immunol.**, v. 13, p. 183-198, 2002.

WAITZBERG, D. L. Ômega-3 : O Que Existe De Concreto ? **Nutrilite**, n. March, p. 1-38, 2012.

YATES, C.M.; CALDER, P.C.; ED RAINGER, G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, p. 272-282, 2014.