



BRUNA DE CASTRO PEREIRA

**EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE $\omega 3$ e $\omega 6$ NA
REGENERAÇÃO DE LESÕES CUTÂNEAS EM *Prochilodus*
*lineatus***

LAVRAS - MG

2017

BRUNA DE CASTRO PEREIRA

**EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE ω 3 e ω 6 NA REGENERAÇÃO
DE LESÕES CUTÂNEAS EM *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Genética, Reprodução e Sanidade de Organismos Aquáticos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof^ª Dra. Priscila Vieira Rosa
Orientadora

Prof^ª Dra. Josilene Nascimento Seixas
Coorientadora

LAVRAS - MG

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Bruna de Castro.

\ "Efeito dos ácidos graxos da série w3 e w6 na regeneração de
lesões cutâneas em *Prochilodus lineatus*\ " / Bruna de Castro
Pereira. - 2017.

66 p. : il.

Orientador(a): Priscila Vieira Rosa.

Coorientador(a): Josilene Nascimento Seixas.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Nutrição. 2. Imunidade. 3. Reparo tecidual. I. Rosa, Priscila
Vieira. II. Seixas, Josilene Nascimento. III. Título.

BRUNA DE CASTRO PEREIRA

**EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS DA SÉRIE ω 3 e ω 6 NA REGENERAÇÃO
DE LESÕES CUTÂNEAS EM *Prochilodus lineatus*
EFFECT OF FATTY ACIDS OF THE SERIES ω 3 and ω 6 IN THE
REGENERATION OF SKIN INJURIES IN *Prochilodus lineatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Genética, Reprodução e Sanidade de Organismos Aquáticos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 10 de abril de 2017.
Prof^a Dra. Josilene Nascimento Seixas UFLA
Prof^o Dr. Luciano José Pereira UFLA
Dr. Renan Rosa Paulino UFU

Prof^a Dra. Priscila Vieira Rosa
Orientadora

LAVRAS - MG

2017

Vocês compreenderam a minha ausência e me deram forças para seguir em

frente... e hoje posso dizer:

Essa vitória é nossa!!!

Aos meus pais, meus irmãos, minhas

afilhadas e meu namorado

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora, eles foram meus parceiros na luta e agora na vitória.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Ciências Veterinárias, pela oportunidade concedida para a realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior– CAPES, pelo auxílio financeiro.

Agradeço à minha mãe Suely e ao meu pai Balthazar, a quem devo tudo o que sou. Eles não me deram apenas a vida, mas me ensinaram a vivê-la.

Aos meus irmãos, Amanda e Luiz Henrique, pelo apoio, amor e carinho.

Aos meus amores, Yasmin e Allana, por serem a minha alegria.

Ao meu namorado Maxwell, por toda a ajuda e incentivo no experimento e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos.

Á todos os meus peixinhos do experimento, em homenagem à sua importância para minha formação.

À minha orientadora Prof^a Dra. Priscila Vieira Rosa, pelos ensinamentos que foram muito além das disciplinas e por me apresentar o fantástico mundo dos ácidos graxos.

A minha co-orientadora, Prof^a Josi Seixas pelas sugestões, amizade e orientação no trabalho.

Ao Prof. Luciano José Pereira pelas sugestões e orientação.

Ao Renan Paulino, pela grande ajuda nas análises estatísticas.

À minha cunhada Camila, pela grande ajuda nas análises hematológicas.

Aos meus cunhados, Elisson e Tamella, meus sogros, Sérgio e Débora e meus tios, João e Solange e minha avó Irene pelo incentivo e afeto.

Às minhas irmãs de coração, Francismara e Régila, por estarem sempre ao meu lado.

À Marcília, Marinez, Eleci e todos do Setor de Piscicultura pelo apoio e amizade.

À todos que me ajudaram no manejo e abate dos peixes, Murilo, Edgar, Kátia, Táfanie, Henrique, Tamira, Ariane, Acsa, Dani e Vinicius.

À Thaiza, Isabela, Maria Júlia, Leilane, Raquel, Suzana e Nayara, por me ajudarem nas análises laboratoriais.

Aos técnicos de laboratório Marcos, Eliane e Márcio.

À CEMIG pela doação dos peixes do experimento.

Às minhas amigas Renata, Mariana e Mirian pelo companheirismo nesses 2 anos.

À D. Lia, Sr. Francisco, D. Dulce e Sr. Antônio pelo carinho.

À todos os meus familiares e amigos, que vibram e torcem por mim a cada novo desafio.

À todos vocês o meu muitíssimo obrigada!!!

*“ Não haverá borboletas, se a vida não passar
por longas e silenciosas metamorfoses ”*

Rubem Alves

RESUMO

Em uma piscicultura intensiva os peixes estão mais susceptíveis a lesões diversas e estas servem como porta de entrada para agentes patogênicos, ocasionando perda econômica. Portanto é de extrema importância que o reparo tecidual deve seja rápido e eficaz para retorno à homeostasia. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da suplementação de diferentes fontes de ácidos graxos da série $\omega 3$ e $\omega 6$ no desempenho, composição bromatológica, parâmetros hematológicos e na regeneração de lesões cutâneas em curimbas (*Prochilodus lineatus*). Foi realizado um ensaio experimental com dietas isoproteicas, isoenergéticas e isolipídicas, com diferentes fontes de óleo (peixe, milho e linhaça). Utilizou-se 216 animais alojados em 12 tanques (250L) em sistema de recirculação, sendo 18 peixes cada. O delineamento foi em blocos casualizados composto de três dietas (fontes de óleo) e quatro classes de peso (blocos) por tratamento. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos para variáveis de desempenho, composição bromatológica e parâmetros hematológicos dos animais. Observou-se que as dietas com óleo de peixe e linhaça aceleraram a regeneração das feridas cutâneas, no 7º dia após a indução da lesão. Os tratamentos com óleo de peixe e linhaça apresentaram uma redução na área da lesão de 24 e 24,8% respectivamente, em relação ao tratamento com óleo de milho. Diante dos resultados obtidos, sugere-se a suplementação com óleo de linhaça em dietas para peixes tropicais, uma vez que a linhaça apresenta grande disponibilidade em relação ao óleo de peixe, sendo mais viável para pisciculturas.

Palavras-chave: Nutrição. Imunidade. Reparo Tecidual. Peixes.

ABSTRACT

In intensive fish farming, fish are more susceptible to diverse lesions and serve as a gateway to pathogens, causing economic loss. Therefore, it is extremely important that tissue repair should be fast and effective for a return to homeostasis. The objective of this study was to evaluate the effect of supplementation of different fatty acid sources of the ω 3 and ω 6 series on performance, bromatological composition, hematological parameters and regeneration of cutaneous lesions in curimbas (*Prochilodus lineatus*). An experimental experiment was carried out with isoproteic, isoenergetic and isolipidic diets, with different sources of oil (fish, corn and linseed). A total of 216 animals housed in 12 tanks (250L) were used in a recirculation system, 18 fish each. The experimental design was a randomized block design consisting of three diets (oil sources) and four weight classes (blocks) per treatment. There were no significant differences ($P > 0.05$) between treatments for performance variables, bromatological composition and hematological parameters of the animals. It was observed that diets with fish oil and flaxseed accelerated the regeneration of cutaneous wounds, on the 7th day after induction of the lesion. The treatments with fish oil and linseed showed a reduction in the lesion area of 24 and 24.8%, respectively, in relation to treatment with corn oil. In view of the results obtained, supplementation with flaxseed oil in diets for tropical fishes is suggested, since flaxseed has great availability in relation to fish oil, being more feasible for fish farms.

Key-words: Nutrition. Immunity. Tissue Repair. Fishes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Via biossintética da prostaglandina.....	29
Figura 2	Regeneração da lesão em curimbas suplementadas com fontes de óleos.....	48
Tabela 1	Composição das rações experimentais.....	38
Tabela 2	Composição química das dietas experimentais.....	39
Tabela 3	Desempenho zootécnico de curimbas (<i>Prochilodus lineatus</i>) alimentadas com rações com diferentes fontes de ácidos graxos.....	45
Tabela 4	Composição química (% da matéria seca) de juvenis de <i>Prochilodus lineatus</i> alimentados com diferentes fontes de óleo.....	46
Tabela 5	Medição da área (cm) da ferida cirúrgica de curimbas suplementadas com óleo de linhaça, milho e peixe.....	46
Tabela 6	Parâmetros hematológicos de curimbas alimentadas com diferentes fontes de óleo.....	50
Tabela 7	Parâmetros hematológicos de curimbas em diferentes tempos de coleta.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AGs	Ácidos Graxos
ARA	Ácido Araquidônico
COX	Ciclooxigenase
DAMP	Danos Moleculares Associados à Lesões
DHA	Ácido Docosa-hexaenóico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra Acético
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
PG	Prostaglandina
TNF	Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE SIGLAS

FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
-----	--

LISTA DE SÍMBOLOS

Ω	Ômega
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
NaCl	Cloreto de Sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1	Prochilodus lineatus	17
2.2	Sistema imunológico dos peixes	17
2.3	Reparo tecidual e o processo inflamatório	20
2.3.1.1	Fase hemostática.....	20
2.3.1.2	Fase inflamatória	21
2.3.1.3	Fase de proliferação e remodelação	21
2.4	Hematologia	23
2.4.1	Neutrófilos.....	24
2.4.2	Macrófagos.....	24
2.4.3	Trombócitos.....	25
2.5	Lipídeos	26
2.5.1	Prostaglandinas.....	28
2.5.2	Dieta e a produção de mediadores lipídicos.....	31
2.5.3	Leucotrienos	32
2.5.4	Lipoxinas	33
2.5.5	Resolvinas e Protectinas	34
3	OBJETIVO	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAL E MÉTODO.....	37
4.1	Dietas experimentais	37
4.2	Delineamento experimental.....	39
4.3	Biometria	40

4.4	Parâmetros de desempenho	40
4.5	Índices corporais.....	40
4.6	Análise bromatológica.....	41
4.7	Indução da ferida cutânea.....	41
4.8	Análise da lesão.....	41
4.9	Análises hematológicas	42
4.10	Análise estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A pele forma a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos, atuando como uma barreira protetora do sistema imunológico inato. Entretanto, esse bloqueio pode ser rompido por uma infinidade de microrganismos, tais como ectoparasitas, bactérias, fungos bem como por trauma físico. Essas podem ocasionar lesões cutâneas, que agravadas por infecções secundárias, podem resultar em depreciação do valor comercial, bem como culminar com a mortalidade dos peixes.

De extrema importância para reduzir os impactos negativos para a piscicultura, o reparo tecidual deve ser rápido e eficaz para retorno da homeostasia do animal. Embora a resposta inflamatória seja bem conhecida em mamíferos e um dos processos fisiopatológicos mais importantes para manter a saúde do hospedeiro, nos peixes, esse fenômeno não é bem conhecido e merece atenção do ponto de vista fisiopatológico.

As membranas biológicas das células da pele são constituídas por uma dupla camada fosfolipídica, rica em ácidos graxos. Os ácidos graxos serão utilizados para a síntese dos mediadores inflamatórios, interferindo em diversas fases do processo de regeneração. A ingestão desses constituintes modifica a membrana da célula e altera os substratos em uma lesão. Nesse ponto de vista, a modificação da dieta de animais lesionados, proporcionará uma nutrição adequada e desempenhará um papel importante na manutenção da fisiologia normal da pele e nos mecanismos de reparo, auxiliando a resolução das lesões.

O óleo de peixe é composto pelos ácidos graxos (AG) ômega 3 (ω 3), o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosaexaenoico (DHA). Ele tem sido amplamente utilizado como uma terapia complementar para o tratamento de doenças e dores inflamatórias, inclusive na cicatrização de feridas em diversas espécies (CALDER, 2011; VEIGAS et al., 2011; NOBRE et al., 2013). Já o óleo de linhaça, apresenta alta concentração de ácido linolênico da série ω 3. Esse composto pode apresentar os mesmos benefícios da utilização do óleo de peixe, através do alongamento e dessaturação por algumas enzimas, originando EPA e DHA. Por outro lado, o óleo de milho, rico em AG's da série ômega 6 (ω 6), tem demonstrado uma forte atuação como mediador pró inflamatório em diversas doenças. No entanto não há até o presente momento, nenhum estudo nutricional, com a utilização de AGs, em peixe lesionados.

A utilização de espécies agressivas em experimentos com lesões dificulta a interpretação dos resultados obtidos, não sendo possível diferir se o dado encontrado foi fruto do tratamento em questão ou da interferência de outros animais do tanque. Por ser um animal

dócil em grupo, a curimba (*Prochilodus lineatus*), é um importante modelo para tais experimentos, o que possibilita isolar o efeito da agressividade.

Desta forma, este trabalho, pioneiro na área, tem como objetivo avaliar a eficácia da suplementação dietética de diferentes fontes de ácidos graxos da série $\omega 3$ e $\omega 6$, na regeneração de lesões cutâneas em peixes juvenis da espécie *Prochilodus lineatus*, popularmente conhecido como curimba.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Prochilodus lineatus*

A contribuição da aquicultura para a produção mundial de alimentos aumentou significativamente nas últimas décadas e este setor fornece agora quase metade do total de peixes e moluscos utilizados para consumo humano (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA - FAO, 2010). O gênero *Prochilodus* está entre os mais abundantes e amplamente distribuídos grupos de peixes da América do Sul, ocorrendo nos rios das Bacias Solimões-Amazonas, Tocantins, São Francisco, Paraná-Paraguai, Paraíba do Sul e Uruguai (SIVASUNDAR et al., 2001; CAROLSFELD, 2003). Na bacia do rio Paraná, o *Prochilodus lineatus* representa de 50 a 90% da biomassa nas regiões mais a jusante do rio e nas lagoas marginais. Segundo Sivasundar et al. (2001), existem três diferentes espécies do gênero *Prochilodus* na bacia do rio São Francisco, sendo *P. lineatus* uma delas.

Essa espécie não apresenta um dimorfismo sexual aparente, dificultando a diferenciação entre machos e fêmeas. (CEMIG/CETEC, 2000; FURUYA, 2001). Por apresentar um comportamento dócil em grupo, a utilização de *Prochilodus lineatus*, facilita a interpretação dos resultados de experimentos com lesões. Além disso, a rusticidade e a relativa facilidade com que se induz a reprodução nessa espécie tornam o cultivo da curimba bastante atrativo (NAKATANI, 2001).

Entretanto, a compreensão acerca da nutrição, fisiologia e imunidade desta espécie, ainda é limitada, apesar de ser uma ferramenta indispensável para a elaboração de dietas artificiais adequadas.

2.2 Sistema imunológico dos peixes

Do ponto de vista evolutivo, os peixes são considerados a primeira classe de vertebrados com imunidade inata e adaptativa (WARR, 1995; TORT et al., 2003). Suas estruturas e funções refletem às adaptações do seu organismo às propriedades físicas, químicas e biológicas do meio em que vive, operando seus mecanismos de defesa eficientemente (PLOUFFE et al., 2005).

Na natureza, os peixes são capazes de se proteger com a ajuda de um complexo mecanismo de defesa inato que pode ser constitutivo ou responsivo (ELLIS, 2009). No entanto, a probabilidade de infecção é muito maior nas pisciculturas devido às práticas intensivas de cultivo comumente adotadas, uma vez que as barreiras de defesa primária tais como o muco e epiderme, podem ser comprometidas através de abrasões físicas, proporcionando fácil acesso dos agentes patogênicos aos tecidos (EISSA et al., 2013). Apesar de certas diferenças, os peixes dependem de respostas imunes tanto celulares como humorais, como nos vertebrados superiores, e têm órgãos dedicados à defesa imunológica (ELLIS, 2009).

Com exceção dos nódulos linfáticos e da medula óssea que são funcionalmente substituídos pelo rim cranial, a maioria dos órgãos linfóides observados em mamíferos também são encontrados em peixes (PRESS E EVENSEN, 1999). Nos teleósteos, o rim cranial é um órgão aglomerular, que bifurca na parte anterior e penetra sob as brânquias (ZAPATA et al., 1996). Apresenta função na hematopoiese, na fagocitose e no processamento do antígeno, auxiliando na formação de imunoglobulina M (IgM) e memória imune através de centros melano-macrófagos (HERRAEZ & ZAPATA, 1986; BRATTGJERD & EVENSEN, 1996). O rim cranial ainda funciona como um órgão endócrino liberando corticosteróides e outros hormônios, sendo central para as interações imuno-endócrinas. O baço geralmente desempenha um papel secundário em relação ao rim cranial nos mecanismos de defesa específicos e não específicos. Este órgão é composto principalmente de células sanguíneas, células endoteliais, células reticulares, macrófagos e melano-macrófagos (KIRON, 2012). Além do seu envolvimento na hematopoiese, está envolvido na depuração das macromoléculas, na degradação / processamento do antígeno e na produção de anticorpos.

Outro órgão imunologicamente importante para os peixes é o timo. Localizado na região dorsolateral da câmara branquial, próximo ao cavo opercular e difundido entre os tecidos musculares, ele é responsável pela produção de linfócitos T e células B geradoras de anticorpos (ZAPATA & AMEMIYA, 2000).

Os centros melano-macrófagos ou agregados de macrófagos que se presume serem análogos primitivos dos centros germinativos dos gânglios linfáticos são vistos principalmente no estroma do tecido hematopoiético do baço, rim e fígado de certos peixes. Eles contêm linfócitos e macrófagos, bem como uma variedade de pigmentos. Estes agregados capturam antígenos e os apresentam à linfócitos, sequestram produtos de degradação celular, melaninas e radicais livres (AGIUS & ROBERTS, 2003).

Os componentes humorais da resposta não específica inibem a aderência e colonização de microrganismos e ocorrem no soro, muco, pele, brânquias e intestino. Incluem vários agentes antimicrobianos tais como tripsina, lisozima, anticorpos, fatores de complemento e outros fatores líticos (ALEXANDER & INGRAM, 1992).

O sistema complemento tem um papel primário na imunidade inata do peixe, facilitando a quimiotaxia, opsonização e destruição de patógenos (HOLLAND & LAMBRIS, 2002), mas também está ligado ao sistema imunológico adquirido, uma vez que a ativação do complemento aumenta a proliferação de células B (MORGAN et al. 2005). Entre os vários componentes do sistema complemento (C3, C7, C4, C5 e fator B) encontrados nos teleostes, o C3 é essencial para todas as vias do complemento. É um constituinte vital do sangue e dos fluidos linfáticos e extravasculares em diferentes órgãos e tecidos (LOVOLL et al., 2007). Eles são principalmente sintetizados no fígado, mas os tecidos extra-hepáticos, tais como o rim cranial, músculo esquelético, brânquias, pele, intestino e baço, também produzem componentes de sistema complemento em quantidades menores, mas biologicamente significativas (LOVOLL et al., 2007). Evidências recolhidas durante os últimos anos utilizando ferramentas genômicas levaram à identificação de vários marcadores de células T (CD4, CD8, CD3, CD28, CTLA-4) e citocinas (interleucinas, interferons e fatores ativadores de macrófagos, fator de necrose tumoral, fator de crescimento transformador, fator quimiotático e fator de inibição da migração de macrófagos)(CASTRO et al., 2011).

A pele é um dos tecidos associados com o sistema imunológico dos peixes. Ela produz lipídeos bioativos que participam dos estados fisiológicos e patológicos, incluindo homeostase, indução, propagação e resolução da inflamação (KENDAL et al., 2015). Fornece em associação com o seu muco, a primeira linha de defesa contra patógenos microbianos e insultos físicos e químicos (NESTLE et al., 2009).

O sistema imunológico cutâneo é altamente organizado, regulado e engloba aspectos da imunidade inata e adaptativa, uma vez que a ruptura dessa barreira pode representar um sério risco para a saúde do hospedeiro (NESTLE et al., 2009). A pele contém um variado perfil de células imunitárias e mediadores, incluindo peptídeos antimicrobianos, proteínas do sistema complemento, mastócitos e fagócitos, como neutrófilos e macrófagos, que realizam a vigilância de rotina do tecido cutâneo e permeiam os vasos sanguíneos (BANGERT et al., 2011). Já o muco é constituído por glicoproteínas, proteoglicanos e proteínas, existentes como uma camada na interface entre o peixe e o ambiente (DALMO et al., 1997). Diversos fatores antimicrobianos ali encontrados inibem a colonização do tegumento por microrganismos potencialmente nocivos (RUANGSRI et al., 2010).

2.3 Reparo tecidual e o processo inflamatório

Nos sistemas de produção intensivos, a alta densidade de estocagem e as constantes brigas dos peixes, atuam como elemento estressante e compromete a sanidade do cultivo, o que acarreta o aparecimento de lesões cutâneas e conseqüentemente prejuízos econômicos aos produtores. Esses desafios iniciam um processo inflamatório, visando à reparação do tecido danificado. Entretanto, apesar de ser um mecanismo normal de defesa do hospedeiro, uma resposta imune excessiva pode causar danos aos tecidos, levando à inflamação crônica (ALBANESI & PASTORE, 2010; CALDER, 2013).

Em peixes, o reparo de lesões na pele é caracterizada por processos inflamatórios da ferida, incluindo as fases de hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação (TAVARES-DIAS, 2009). A duração e a magnitude da inflamação dependem de processos fisiológicos concorrentes e mecanismos que amplifiquem a inflamação e programas de frenagem endógena que controlam a resolução da inflamação (DOONG-SOON, 2012).

2.3.1.1 Fase hemostática

O processo de regeneração de lesões em peixes começa com a hemostasia, mecanismo do corpo para limitar a hemorragia. As membranas de células feridas liberam vasoconstritores, tromboxano A₂ e prostaglandina 2 α , promovendo a formação de coágulos (KÄMPFER et al., 2005; TAVARES-DIAS, 2009). À medida que os vasos sanguíneos se constroem, as plaquetas circulantes ativam-se pelo colágeno exposto e liberam mediadores químicos, promovendo a agregação e ativação plaquetárias (DRYDEN et al., 2013). O colágeno exposto também desencadeia a cascata de coagulação que possibilita a formação de uma matriz de fibrina, que suporta o tampão de plaquetas e outras células invasoras (leucócitos, células endoteliais, fibroblastos) (CASTILLO-BRICEÑO et al., 2009). O tampão plaquetário e as proteínas adesivas (fibronectina) formam uma matriz provisória, ou coágulo de fibrina. A matriz provisória é crucial para a hemostasia precoce e previne sangramento após a lesão.

2.3.1.2 Fase inflamatória

Após a hemostasia inicial, as células detectam moléculas liberadas por tecidos lesionados, sendo essas moléculas denominadas padrões moleculares associados a lesões (DAMPs). Os sinais gerados pelos DAMPs estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, por células sentinelas, como os macrófagos, desencadeando aumentos locais no fluxo sanguíneo, atração de células de defesa e aumento da permeabilidade vascular, permitindo que moléculas antimicrobianas e células inundem os tecidos acometidos (TIZARD, 2009). O colágeno tipo I em *Sparus aurata*, peixe teleósteo, pode atuar como DAMPs, aumentando a explosão respiratória em leucócitos e os níveis de RNAm do gene codificante para a IL-1 β e outras moléculas pró-inflamatórias em fagócitos (CASTILLO-BRICEÑO et al., 2009).

O fator de crescimento derivado de plaquetas e o fator de crescimento transformador β , liberados pelos trombócitos, são quimiotáticos para neutrófilos circulantes e monócitos, recrutando-os para o local da ferida. Adicionalmente, as citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral- α , interleucina-1e interleucina-6 atuam como sinais quimiotáticos para os neutrófilos (DELAVARY et al., 2011).

A marginação e aderência dos neutrófilos ao longo da parede das células endoteliais adjacentes à ferida conduzem à diapedese, ou seja, passagem para o local lesionado. Os neutrófilos começam a eliminar detritos bacterianos e necróticos do local ferido, liberando enzimas proteolíticas. Em seguida, os monócitos circulares são atraídos e transformados em macrófagos na área da lesão (DRYDEN et al., 2013). Os macrófagos liberam citocinas e enzimas adicionais para regeneração de feridas. Os respondedores celulares durante a fase inflamatória promovem a formação precoce de tecido de granulação e o desbridamento de tecido, estabelecendo o estágio para a fase proliferativa.

Em peixes, diversos autores demonstraram que na primeira hora após a injúria, diferentes tipos de leucócitos migram para o local inflamatório. Iger & Abraham (1990) observaram que 1 hora após um processo de injúria em *Cyprinus carpio*, os macrófagos eram os principais responsáveis pelo desbridamento da ferida e que número desses fagócitos novamente aumentava após 48 horas.

2.3.1.3 Fase de proliferação e remodelação

As principais alterações durante a fase de proliferação incluem epitelização, angiogênese e granulação.

A epitelização ocorre em uma membrana basal intacta ou na margem da ferida. É estimulada pelo fator de crescimento epidérmico e pelo fator de crescimento transformante α e macrófagos. Os fibroblastos sintetizam e liberam fatores de crescimento e interleucina-6, que ativam a migração celular sobre a ferida, criando uma barreira precoce (DRYDEN et al., 2013). Mittal & Datta Munshi (1974) acompanharam a migração de células epiteliais em *Rita rita* e fizeram referência quanto à migração celular das bordas da ferida em relação ao centro recobrimo a lesão, a nível histológico, entre quatro e seis horas. Esse mesmo tempo de evolução, foi observado por Dutta & Ray (1994), em *Clarias batrachus*. Já em salmão do atlântico, Anderson & Roberts (1975), descreveram o recobrimento da ferida após três horas, similarmente ao observado por Iger & Abraham (1990) em *Cyprinus carpio*. Todos os autores citados induziram nos peixes feridas cirúrgicas que variavam de 0,2 a 0,6cm.

Estimulada pelo fator de necrose tumoral- α , a angiogênese, é a formação de novos capilares dentro do leito da ferida. Os novos vasos sanguíneos promovem o fluxo sanguíneo para gerenciar o aumento da atividade metabólica dentro da ferida. Como resultado da angiogênese, existe uma maior disponibilidade de oxigênio e acesso celular imune a detritos celulares e contaminantes bacterianos para depuração.

Após o debridamento da lesão pelas células inflamatórias, a derme lesada começa a ganhar volume para a formação do tecido de granulação, iniciando a fase de proliferação dos fibroblastos (DELAVERY et al., 2011). O tecido de granulação é uma rede densa de capilares recém-formados e vasos sanguíneos, fibroblastos e fibras de colágeno depositadas aleatoriamente. O tecido de granulação forma-se à medida que os fibroblastos migram para o local da ferida a partir das áreas circundantes, tornam-se ativados, sintetizam o colágeno e proliferam (DRYDEN et al., 2013). Os capilares transportam nutrientes e oxigênio para suportar a elevada taxa metabólica de migração celular, divisão e síntese de proteínas. De acordo com Moraes et al. (2003), em peixes a angiogênese é máxima no sétimo dia, permanecendo intensa até o 14º dia, para então regredir. A proliferação fibroblástica começa a ser observada no sétimo dia, onde é possível notar a existência de fibras colágenas dispostas desorganizadamente ou desalinhas. Aos 14 dias elas se mostram em maior quantidade e mais organizadas. Macroscopicamente as áreas lesionadas não têm sua forma e tamanho modificado até o 14º dia (ANDERSON & ROBERTS, 1975; IGER & ABRAHAM 1990; DUTTA & RAY, 1994; MORAES et al., 2003).

A ativação de macrófagos na lesão, a elaboração de fatores de crescimento específicos e o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno no local, fazem com que a matriz extracelular comece a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e mais elástico (BALBINO et al., 2005). Além desta fibroplasia ativa, ocorre a proliferação e diferenciação de células epidérmicas, restabelecendo a integridade da epiderme, contração da ferida e neoangiogênese (DELAVARY et al., 2011). Na fase de remodelamento há um balanço entre as taxas de síntese de colágeno, sua degradação e seu remodelamento (BAUM & ARPEY, 2005).

De acordo com Tavares-dias (2009), gradativamente a área ao redor da ferida em peixes, vai se tornando escura pela deposição de melanina, cujos grânulos aparecem livres ou no interior de macrófagos, quando observadas à microscopia de luz. A melanina tem propriedade bactericida (ELLIS, 1977) e os melanócitos podem desempenhar papel preventivo às infecções secundárias após a injúria (IWASHITA et al., 2009).

Como último evento no processo de regeneração dos tecidos, constata-se a formação das escamas processando-se da periferia para o centro da lesão (TAVARES-DIAS, 2009).

2.4 Hematologia

Os parâmetros sanguíneos podem fornecer informações importantes para a avaliação do estado nutricional e imunológico dos peixes, uma vez que atuam como indicadores biológicos no acompanhamento da saúde tanto dos animais em questão, quanto do ambiente, sendo uma ferramenta chave na identificação de estresse e enfermidades. Estudos citoquímicos de leucócitos de peixes parecem sustentar o uso da terminologia empregada em mamíferos na classificação de leucócitos (ZELIKOFF, 1998). Em geral no esfregaço de sangue periférico de peixes da classe *Osteichthyes* (peixes teleósteos) relatam-se neutrófilos, linfócitos e monócitos. Eosinófilos e basófilos são raros no sangue desses animais (THRALL et al., 2006).

Os rins, baço e timo são os órgãos hematopoiéticos dos peixes. O timo, primeiro órgão linfóide que se desenvolve, coloniza o baço e os rins com linfócitos. Células progenitoras encontradas nos rins, têm mostrado ser capazes de se diferenciar em eritrócitos, trombócitos, linfócitos, granulócitos e monócitos (MORITOMO et al., 2004; KOBAYASHI et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2007).

2.4.1 Neutrófilos

Os neutrófilos são essenciais para a resposta inflamatória aguda, constituindo a primeira linha de defesa contra agentes patogênicos. O envolvimento celular na resposta inflamatória em peixes teleósteos parece ser bifásico, começando com esse influxo de neutrófilos, seguido da chegada de monócitos / macrófagos. Os neutrófilos se originam a partir do rim cranial, onde ao receberem os sinais necessários, entram na circulação e são observados num processo de marginação em direção ao endotélio capilar, antes de atravessar a parede do vaso sanguíneo para o local de inflamação. (REITE & EVENSEN, 2006).

Uma das principais diferenças entre peixes e mamíferos refere-se ao número relativo de neutrófilos em circulação. Considerando que, em mamíferos (seres humanos e suínos) neutrófilos representam a maior quantidade de leucócitos em circulação (40%-70% e 30%-40%, respectivamente), em teleósteos, constituem menos de 5% de leucócitos circulantes durante períodos de homeostase, sendo o rim o principal abrigo para maioria das populações neutrofílicas (SCHARSACK et al., 2003; KATZENBACK & BELOSEVIC, 2009; WOO et al., 2011; HAVIXBECK et al., 2015). No entanto, este número pode aumentar para cerca de 50% imediatamente após desafio intraperitoneal com zymosan (HAVIXBECK et al., 2015). Uma vez no local da inflamação, Havixbeck e colaboradores (2015) verificaram que os neutrófilos possuíam a capacidade para mediar respostas pró e anti-inflamatória em tempos divergentes. 18 horas após o desafio, os neutrófilos presentes no local exibiram uma característica pró-inflamatória clássica com aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e liberação de leucotrieno B4 (LTB4). Já com 48 horas, os neutrófilos apresentavam uma maior capacidade de modular a função dos macrófagos, diminuindo a produção de ROS e aumentando lipoxina A4 (LXA4), caracterizando a fase pró-resolutiva da inflamação.

O pensamento convencional tem assumido que neutrófilos apresentam uma via uni direcional, terminando com a sua morte no local da inflamação. No entanto, um estudo com peixes-zebra, demonstrou que os neutrófilos são capazes de quimiotaxia retrógrada de volta para a vasculatura, ou seja, podem emigrar de tecidos danificados por um processo de transmigração reversa (MATHIAS et al., 2006).

2.4.2 Macrófagos

O reconhecimento inicial de danos celulares ou de agentes patogênicos é mediado pelos macrófagos residentes de tecido através de vários receptores de reconhecimento de padrão, tais como os receptores do tipo *Toll* (TIZARD, 2009). Em resposta a estímulos distintos, esses macrófagos ativam-se para produzir uma ampla variedade de citocinas e moléculas bioativas, algumas das quais atraem outras células para o local da inflamação, e outras que ditam o curso de uma resposta inflamatória e eventual reparação de tecidos (GRAYFER & BELOSEVIC, 2012). As principais citocinas inflamatórias produzidas por essas células são o fator de necrose tumoral α (FTN α), interleucina 1 (IL1) e interleucina 6 (IL6). Assim como outras células sentinelas estimuladas, os macrófagos sintetizam a enzima cicloxigenase 2 (COX2), responsáveis pela síntese dos lipídeos inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos.

Os macrófagos que chegam aos tecidos lesionados são originários de monócitos derivados do sangue, sendo que a monocitopoiese em teleósteos normalmente ocorre no rim cranial e no baço (REITE & EVENSEN, 2006). Depois da chegada ao local de inflamação, os macrófagos tornam-se estimulados com o aumento da atividade antimicrobiana e aumento do potencial fagocitário. Esta célula imune é provavelmente responsável pela organização do processo de regeneração de lesões ao longo das diferentes fases (LEIBOVICH & ROSS, 1975; DEVALARAJA et al., 2000; MIRZA et al., 2009, LUCAS et al., 2010).

Os monócitos de peixes são células fagocíticas ativas que participam da resposta inflamatória aguda. Na contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de peixes em homeostase, existe uma pequena quantidade desse tipo celular, < 5%. Nesses animais, uma monocitose sugere resposta inflamatória (THRALL et al., 2006).

2.4.3 Trombócitos

O sangue de peixe coagula em resposta à lesão, como acontece em outros vertebrados. Durante o processo de coagulação são formados fibrinopeptídeos, após a clivagem do fibrinogênio, sob o controle da trombina. A agregação de trombócitos de peixes é diferente da agregação plaquetária em mamíferos. Em peixes, os trombócitos convertem o ácido araquidônico em prostaglandinas e em pequena quantidade de tromboxanos; por outro lado o tromboxano é potente indutor de agregação plaquetária em mamíferos (THRALL et al., 2006). Matushima & Mariano (1996) verificaram que a injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias induz reação inflamatória caracterizada por congestão vascular, acúmulo

predominante de trombócitos e macrófagos e edema. Os autores colheram de 63 a 90% de trombócitos, após 3 e 72 horas, respectivamente. Em pacu, após 6 horas da injeção de carragenina, encontrou-se valores de trombócitos a 83,6% (MARTINS et al., 2006). Já em ratos, aplicação do mesmo agente, provoca resposta bifásica, onde, após 4 horas observa-se 90% de neutrófilos, percentual que se reduz para 60% após 24 horas e após 48 horas predominam os mononucleares com cerca de 80% do total de leucócitos (MORAES et al., 1987).

Em *Piaractus mesopotamicus*, a injeção de tioglicolato, LPS e *Aeromonas hydrophila*, induz ao acúmulo predominante de trombócitos, seguidos de macrófagos e menor número de linfócitos. Essas proporções foram verificadas 6 horas após a aplicação, atingido o máximo (de quatro a sete vezes mais) após 24 horas (TAVARES-DIAS, 2009). Já em tilápias a administração de adjuvante incompleto de Freud resultou em elevadas contagens de trombócitos na cavidade peritoneal (Vale et al., 2002). O componente celular, dessa mesma espécie, desafiada com carragenina, demonstrou ser composto por 63% de trombócitos e 17% de macrófagos, 3 dias após o estímulo (MATUSHIMA & MARIANO, 1996).

2.5 Lipídeos

Os experimentos com lipídeos vêm ganhando espaço nas mais variadas áreas de publicações, tanto humana quanto nos demais animais. O grande interesse nesses estudos reflete a complexidade que envolve o metabolismo desses compostos (HATANAKA et al., 2007).

Os lipídeos podem ser classificados de acordo com sua estrutura e função, apresentando em comum à baixa solubilidade em água. Os triacilgliceróis, principais constituintes dos óleos e gorduras, representam a classe mais expressiva dos lipídeos neutros presentes nos alimentos. Eles são constituídos de três moléculas de ácidos graxos, esterificadas aos grupos hidroxila do glicerol. Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o número de insaturações, sendo chamados monoinsaturados (MUFA) quando apresentam apenas uma insaturação; poli-insaturados (PUFA) com duas ou mais insaturações; e com quatro ou mais insaturações são chamados altamente insaturados (HUFA). Caso não apresentem nenhuma insaturação são denominados saturados (SAFA) (TOCHER, 2003).

Devido à ausência de enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, os PUFAs não podem ser sintetizados por vertebrados, devendo ser fornecidos na dieta (SARGENT et al., 2002). Os

ácidos graxos de cadeia longa (LC) têm papéis estruturais importantes como componentes de fosfolipídeos, sendo os principais integrantes das biomembranas celulares, que confere várias propriedades funcionais ao afetarem tanto as propriedades físico-químicas da membrana (fluidez), bem como na influência funções das proteínas de membrana (receptores, transportadores e enzimas) (TOCHER, 2010).

Os ácidos graxos apresentam dois tipos de essencialidade, a nutricional e a fisiológica. Os nutricionalmente essenciais são aqueles AG que devem estar presentes na dieta, sendo utilizados como precursores para a síntese dos ácidos graxos fisiologicamente essenciais, por meio de reações de alongamento e dessaturações, são eles o ácido linoleico (C18:2 ω 6) e o ácido linolênico (C18:3 ω 3) (TOCHER, 2003). Já os fisiologicamente essenciais são aqueles importantes para as funções metabólicas do indivíduo, são esses o ácido araquidônico (ARA- ω 6), ácido eicosapentaenóico (EPA- ω 3) e ácido docosa-hexaenóico (DHA- ω 3).

Um ácido graxo pode sofrer ação de enzimas alongases, aquelas que adicionam átomos de carbono na cadeia, e de enzimas dessaturases, que atuam na oxidação de dois carbonos e na adição de uma dupla ligação na cadeia (BRETT & MÜLLER-NAVARRA, 1997; MARTIN, et al. 2006). Existe uma distinção entre as espécies de água doce e as espécies de água salgada quanto à sua habilidade de converter o ácido linoleico em ARA e o linolênico em EPA e DHA (SARGENT et al., 1997; BELL & SARGENT, 2003; TOCHER, 2010). Os peixes marinhos, apresentam baixa atividade das enzimas C18-C20 alongase e Δ 5 dessaturase, não conseguindo realizar tal conversão, sendo totalmente dependentes da dieta para suprir a demanda do organismo de ARA, EPA e DHA (SARGENT et al., 1999a, 1999b; TOCHER, 2010). Salmonídeos e muitas espécies de água doce têm percursos completos e podem biossintetizar EPA e DHA a partir ácido linolênico (MONROIG et al., 2011; TOCHER, 2010).

Nos peixes de água doce, o fígado é responsável por grande parte da produção de ARA, EPA, DHA. A síntese de EPA a partir de 18:3n-3 ocorre por dessaturação na posição Δ 6, seguida por um alongamento de dois carbonos na cadeia e posteriormente, por mais uma dessaturação na posição Δ -5. Já na síntese do DHA, o 22:5n-3 sofre alongação, se transformando em 24:5n-3 que, por sua vez, é convertido, por dessaturação Δ 6, em 24:6n-3. Por meio de reações de encurtamento de cadeia nos peroxissomas, o 24:6n-3 é convertido em 22:6n 3. Esse encurtamento de cadeia é a única reação que ocorre no espaço extramicrosomal (LUTHRIA et al., 1996; SPRECHER, 2000; BELL & SARGENT, 2003; TOCHER, 2003).

As mesmas enzimas alongases e dessaturases atuam em ácidos graxos ω 3 e ω 6 havendo uma competição entre as duas séries de PUFA's. Devido a essa competição

enzimática dos ácidos graxos preconiza-se uma proporção na ingestão de $\omega 6 : \omega 3$ (BORGES et al., 2014). A essencialidade de LC-PUFA têm papéis funcionais mais específicos como importantes reguladores do metabolismo, quer com eles próprios ou seus derivados. Essa regulação pode ser extracelular, à nível dos tecidos, por meio de derivados de LC-PUFA incluindo mediadores lipídicos, tais como prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas, resolvinas e protectinas, ou intracelular como ligantes para fatores de transcrição que controlam a expressão gênica (TOCHER, 2010). Quando um tecido é danificado suas fosfolipases atuam sobre os fosfolipídeos da parede celular, liberando ácidos graxos, AA ou EPA. Esses AGs são então convertidos em leucotrienos, através da enzima 5-lipoxigenase, ou em prostaglandinas a partir da enzima COX. Esses lipídeos são chamados coletivamente de mediadores lipídicos.

O desbalanceamento na relação de ácidos graxos poli-insaturados da dieta, pode causar alterações nas respostas metabólicas, afetando as respostas ao estresse oxidativo (MELO et al., 2014), respostas inflamatórias (CALDER, 2003) e estimulando a produção de mediadores inflamatórios (ALLAYEE et al., 2009). Tais resultados demonstram que os desequilíbrios nutricionais, particularmente durante os estágios larvais e juvenis, têm um efeito profundo no crescimento, na resistência à doença e na sobrevivência dos peixes (KIRON, 2012).

Apesar dos inúmeros benefícios do óleo peixe para o organismo, existem restrições com relação a sua utilização na aquicultura. A principal restrição é que este é um recurso finito marinho, com produção necessariamente limitada por meio de uma rígida regulamentação das quotas de pesca e de captura (SHEPHERD & JACKSON, 2013). As pressões sobre as unidades populacionais de peixes selvagens à medida que a produção de aquicultura cresce juntamente com uma maior concorrência para as fontes de LC-PUFA das indústrias nutracêutica e farmacêutica resultaram em mudanças nas formulações de alimentos para aquicultura. Os ingredientes terrestres, tais como as fontes vegetais, principalmente de origem oleaginosa, como óleo de linhaça e milho, são cada vez mais utilizados nos alimentos para peixes, sem detrimento da saúde ou do crescimento dos animais (BELL et al., 2004)

2.5.1 Prostaglandinas

As prostaglandinas (PGs) são pequenas moléculas derivadas de ácidos graxos poli-insaturados liberados dos fosfolipídeos da membrana celular através da ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2) (Fig.1). Elas desempenham um papel significativo no progresso da resposta imune em múltiplos níveis, muitas vezes em conjunto com ligantes microbianos,

citocinas e vários outros fatores (SIMMONS et al., 2004). Dependendo do precursor de ácidos graxos, serão produzidas diferentes séries de PGs: PGs série 2 são produzidas a partir do AA e PGs série 3 são produzidos a partir do EPA. Assim, o primeiro passo limitante na biossíntese de PG é a biodisponibilidade destes ácidos graxos (GÓMEZ-ABELLÁN & SEPULCRE, 2016). O segundo passo limitante refere-se às enzimas ciclooxigenases (COX, também conhecidas como prostaglandina G/H sintase e prostaglandina-endoperoxídeo sintase 2) que convertem AA ou EPA em PGH₂ ou PGH₃, respectivamente (Fig.1). Existem pelo menos duas isoformas de COX, as isoformas constitutivas (COX-1) e indutíveis (COX2). COX-1 é expressa em muitos tipos de células distribuídas por todo o corpo, enquanto que a expressão de COX-2 é altamente restrito sob condições basais e *up-regulation* durante a inflamação em diferentes tipos de células (SIMMONS et al., 2004).

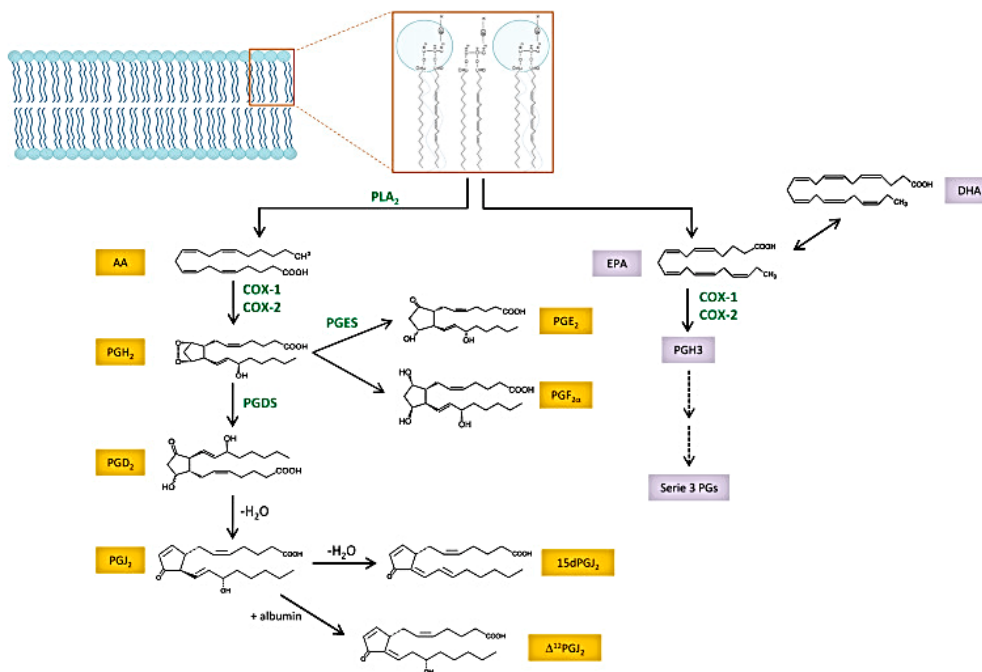


Fig.1 Via biossintética da prostaglandina.

Fonte: GÓMEZ-ABELLÁN & SEPULCRE, 2016.

A PGH₂ é convertida em PGE₂ pela ação da PGE sintase (PGES, Fig. 1) (JOO & SADIKOT, 2012). Em mamíferos, existem várias isoformas dessa enzima: o PGES citosólico (cPGES) e o PGES associado à membrana ou PGES microssomal (mPGES)(MURAKAMI et al., 2002). Uma destas sintases (mPGES-1) é altamente indutível e apresenta acoplamento funcional com enzimas COX-2 a montante nas células. No peixe-zebra, a existência de

homólogos de mPGES-1 e c-PGES tem sido relatada juntamente com uma aparente correlação entre mPGES-1 e perfil de expressão de COX-2 (PINI et al., 2005).

A PGH2 é ainda convertida, conduzindo à geração de PGD2 através da ação da PGD sintase (PGDS, Fig. 1). Bayne e colaboradores (2001) identificaram a presença de PGD sintase em fígados de truta arco-íris desafiadas com uma bactéria, *Vibrio anguillarum*. Um trabalho recente relatou a existência de dois ortólogos do L-PGDS de mamíferos (PGDS1 e PGDS2) na dourada (GOMEZ-ABELLAN et al., 2015). A análise e o seu perfil de expressão mostraram que o PGDS2 não é expresso em fagócitos de rim cranial. Em contraste, o PGDS1 é expresso nestas células e regulado positivamente em granulócitos acidófilos de rim cranial por estimulação com diferentes padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os resultados mostraram uma correlação entre os perfis de expressão de PGDS1 e a liberação de PGD2. Além disso, vários homólogos para L-PGDS de mamífero estão disponíveis nas bases de dados do genoma do peixe-zebra. O estudo da atividade enzimática de um destes homólogos mostrou que não foi capaz de converter PGH2 em PGD2 (FUJIMORI et al., 2006). No entanto, é necessário um trabalho adicional para esclarecer se as enzimas L-PGDS são responsáveis pela síntese de PGD2 em peixes.

Existem ainda mais dois grupos de prostaglandinas pró inflamatórias: os tromboxanos, produzidos por plaquetas, e as prostaciclina, produzidas por células endoteliais vasculares, sendo que estas apresentam funções antagônicas.

Existem poucos relatos sobre a disponibilidade dos ácidos graxos e sua contribuição para a produção de PG nos peixes (GÓMEZ-ABELLÁN & SEPULCRE, 2016). O primeiro estudo a este respeito foi realizado por Matsumoto et al. em 1989, utilizando suspensões de trombócitos de diferentes espécies de peixes. Seu estudo revelou que a incubação de trombócitos com AA resultou na produção de PGF₂ α , PGE₂ e PGD₂ em todas as espécies estudadas, embora dentre as espécies testadas apenas os trombócitos de peixe-rocha pudessem metabolizar o EPA, produzindo principalmente PGE₃ e PGD₃. Pesquisas mais recente demonstraram que a administração exógena de AA ou/e EPA a leucócitos de peixe em cultura aumenta significativamente a produção de PGE de uma forma dependente da concentração. Em leucócitos de rim cranial de bacalhau do atlântico, a suplementação de culturas com uma combinação de AA e EPA promoveu um aumento na produção de PGE₂ e PGE₃ enquanto a suplementação com AA sozinho, só aumentou os níveis de PGE₂ (FURNE et al., 2013). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se macrófagos renais de corvina amarela, nos quais a suplementação com AA aumentou a produção de PGE₂ de forma dependente da dose (LI et al., 2012), enquanto que apenas as doses mais elevadas de EPA não tiveram

qualquer efeito na geração de PGE2 (LI et al., 2013). Nos ensaios de suplementação, AA e EPA são, presumivelmente, incorporados nas membranas celulares como ocorre com ácidos graxos dietéticos. Em relação ao possível efeito da PGE2 no meio inflamatório, a suplementação de culturas de macrófagos de rim cranial com AA ou EPA também não teve efeito significativo na produção de interleucina-1 β (IL-1 β), apesar do aumento da produção de PGE2. A falta de estímulos imunes neste processo pode explicar este resultado (LI et al., 2012; 2013).

O óleo de peixe, apresenta em sua composição os ácidos graxos altamente insaturados da série ω 3, o EPA e DHA. Esses compostos são metabolizados em mediadores lipídicos com ação anti-inflamatória e ainda podem ser convertidos em resolvinas, protectinas e maresinas com importante ação pró resolutiva (LOBO et al., 2016), modulando potencialmente a inflamação e os marcadores de estresse oxidativo (SILVA et al., 2015). Lobo e colaboradores (2016), avaliaram os efeitos de doses orais de ω 3 em ratos com dor inflamatória induzida pelo adjuvante completo de Freund (CFA). Os resultados indicaram que o grupo tratado com ω 3 reduziu eficazmente a dor inflamatória num curto período de tratamento, através da modulação do TNF- α e das resolvinas, com relação ao grupo controle. Também nessa espécie, a suplementação com diferentes proporções de EPA:DHA, evidenciaram uma modulação na atividade das enzimas COX e LOX, diminuindo a produção de eicosanoides pró inflamatórios e refletindo um ambiente menos oxidativo, demonstrando o efeito protetor exercido pela diminuição a razão ω -6 / ω -3 no plasma e nas membranas (SILVA et al., 2015).

2.5.2 Dieta e a produção de mediadores lipídicos

Os ácidos graxos cumprem uma variedade de papéis dentro das células imunes. Os fosfolipídeos da membrana celular, como precursores para a síntese de mediadores lipídicos bioativos, regulam a resposta imune através da produção de mediadores lipídicos (CALDER, 2008). A composição lipídica das células e a produção de mediadores podem ser modificadas através da suplementação dietética de certos ácidos graxos. Nesse sentido, a substituição do óleo de peixe por fontes vegetais na dieta e seus efeitos sobre o sistema imunológico de teleósteos, tem sido extensivamente estudado (BELL et al., 1992; 1994; 1995; 1996; 1998; GANGA et al., 2005).

Um estudo realizado com salmão do atlântico por Bell e colaboradores (1992) mostrou que o aumento da ingestão de ácido linoleico resultou em maior proporção de AA, em

comparação com EPA, em fosfolipídeos de membrana de leucócitos, o que resultou em alterações nos perfis de produção de mediadores lipídicos. De forma semelhante, um estudo realizado em dourada (GANGA et al., 2005) mostrou que a substituição do óleo de peixe por óleos vegetais ricos em ácidos oleico, linoleico e linolênico em dietas, afetou a composição de ácidos graxos dos leucócitos sanguíneos, reduzindo o conteúdo de EPA e ligeiramente o AA. Contudo, enquanto a concentração de PGE2 plasmática não foi afetada, houve uma correlação entre a concentração plasmática de PGE3 e EPA.

Alguns autores já demonstraram a produção de PGE2 por leucócitos, principalmente macrófagos, em diferentes espécies de peixes, bem como seus efeitos nas atividades imunológicas relevantes (GÓMEZ-ABELLÁN & SEPULCRE, 2016). Secombes et al (2001), verificaram que a adição exógena de PGE2 à leucócitos de rim cranial de truta inibe a sua resposta proliferativa, regulando a expressão de IL-10, IL-6 e COX-2 e regula negativamente a expressão de IFN γ , TNF α . Além disso, foi demonstrado que a PGE2 modula a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em leucócitos renais de *Gasterosteus aculeatus* (KUTYREV et al., 2014) e *Scophthalmus maximus* (PARAMA et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por Novoa et al. (1996) trabalhando com trutas. Contudo, os perfis de expressão das enzimas que regulam a produção de PGE2 em fagócitos de peixes, as suas atividades biológicas em diferentes populações de fagócitos e as vias de sinalização intracelular que medeiam os seus efeitos são largamente desconhecidos.

Além dos mecanismos já demonstrados, a modulação dos fatores de transcrição à nível de Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissoma (PPAR) pode também explicar os efeitos anti-inflamatórios dos ácidos graxos ω 3 (DOONG-SOON, 2012). Em 2008, Marion-Letellier et al., trabalhando com enterócitos e células dendríticas humanas estimuladas com interleucina 1, demonstraram que EPA e DHA aumentaram os níveis de PPAR- γ e reduzindo a produção das citocinas pró-inflamatórias, interleucina 8 e interleucina 6, sendo que a intensidade dos efeitos estava ligada ao número de insaturações desses AG.

2.5.3 Leucotrienos

Os leucotrienos são biosintetizados através de conversão enzimática sequencial das lipoxigenases, principalmente por células fagocitárias, tais como os neutrófilos, macrófagos, atuando como uma potente molécula quimiotáctica e amplificando a inflamação aguda (KENDALL & NICOLAOU, 2013).

Os leucotrienos, advindos do ácido araquidônico, como o LTB₄, aumentam a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo local, além de atuarem na indução da liberação de enzimas lisossomais e no aumento da produção do TNF α , IL1, IL6, IFN- γ e de espécies reativas do oxigênio (PETERS-GOLDEN & HENDERSON, 2007). Em contraste, os leucotrienos da série 3, produzidos pelos AG da série ω 3, estimulam a síntese de outros tipos de mediadores lipídicos, tais como lipoxinas, resolvinas e protectinas favorecendo a resolução de processos inflamatórios (KENDALL & NICOLAOU, 2013).

2.5.4 Lipoxinas

As lipoxinas foram os primeiros mediadores lipídicos reconhecidos com atividades tanto anti-inflamatória quanto pró-resolutiva (SORDI et al., 2012), sendo produzidas pela ação sequencial das lipoxigenases (GODSON et al., 2000). A biossíntese de lipoxinas é realizada, entre outros tipos de células, nas células epiteliais, endotélio vascular e leucócitos, mediante interações que são reguladas por citocinas específicas (GARLET, 2010). Na resposta inflamatória, elas são geradas essencialmente no interior do lúmen vascular por interações plaquetas-leucócitos (KENDALL & NICOLAOU, 2013).

A lipoxina A₄ (LXA₄) fornece potentes sinais para diferentes tipos de células, tais como neutrófilos e monócitos, nos quais bloqueia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL-1 β , inibindo assim tráfego de neutrófilos para o local afetado. A LXA₄ é secretada por macrófagos e também estimula a atividade fagocitária, o que implica um importante mecanismo pró resolutivo ajudando a restaurar a homeostase do tecido.

Nos últimos anos, mediadores lipídicos especializados na resolução da inflamação, derivados de ácidos graxos essenciais poli-insaturados ω 3, foram identificados como sinais término do processo inflamatório e na indução dos mecanismos de reparação de tecidos (BANNENBERG et al., 2005). Dentro deste grupo estão as resolvinas e as protectinas, capazes de modular a duração e magnitude da inflamação aguda. Com as propriedades anti-inflamatórias e pró resolutivas, elas detém a infiltração de neutrófilos e promovem a sua apoptose, reverterem a vasodilatação e a permeabilidade vascular, promovem mecanismos de defesa antimicrobianos e coordenam a limpeza das células inflamatórias mediante a fagocitose por macrófagos, limitando assim a progressão de uma inflamação aguda para crônica, e evitando maiores danos nos tecidos (SERHAN et al., 2000).

2.5.5 Resolvinas e Protectinas

As resolvinas são potentes mediadores pró-resolutivos da inflamação, da qual deriva o seu nome, tendo duas formas químicas, séries E e D, produzidas a partir de EPA e DHA respectivamente. As resolvinas da série E formam parte dos grânulos de neutrófilos e estimulam as funções fagocíticas dos macrófagos, e a sua adição às células dendríticas (SERHAN et al., 2009). Ambos, resolvina E1 (RvE1) como resolvina E2 (RvE2) inibem significativamente a migração trans endotelial de neutrófilos em relação ao local lesionado (SERHAN et al., 2008). Por outro lado, a resolvina E1 pode atuar em BLT1 (receptor de leucotrieno B4), através da antagonização das respostas quimiotáticas induzidas por leucotrieno B4 e conseqüentemente na inibição da migração de neutrófilos (DOONG-SOON, 2012). Além disso, resolvina E1, inibe o recrutamento de neutrófilos, regula a produção de quimiocinas / citocinas, promove a remoção linfática de fagócitos, previne a perda de tecido conjuntivo e osso, promove a cicatrização de tecidos doentes, inibe a dor e diminui a expressão de genes pró-inflamatório em muitos modelos de doença inflamatória, tais como periodontite, colite e dor inflamatória (SERHAN et al., 2009, DOONG-SOON, 2012). Esses compostos atuam na proteção contra doenças periodontais, prevenindo o estabelecimento de uma resposta crônica após infecção por patógenos, tais como a *Porphyromonas gingivalis*. Em 2006, Hasturk et al., avaliaram o potencial pró resolutivo de RvE1 na periodontite. O tratamento concluiu que a aplicação tópica favoreceu a resolução completa da inflamação periodontal e restauração de tecidos, melhorando a aparência irregular, edematosa e hiperêmica da gengiva. Uma pesquisa mais recente (AZUMA et al., 2017) analisou o efeito da suplementação com EPA+DHA, por 45 dias, em 28 ratos com periodontite apical. Os resultados demonstram que o ω 3 não apenas suprime a reabsorção, mas também promove nova formação óssea na área periapical em conjunção com *downregulation* da infiltração de células inflamatórias na lesão, através da ação de resolvinas e protectinas. Também em coelhos, a aplicação tópica de óleo de peixe, apresentou um efeito protetor sobre a periodontite, diminuindo as respostas inflamatórias do hospedeiro à *Porphyromonas gingivalis*. Esta diminuição da reação inflamatória resulta em menor degradação do tecido, tornando esses microrganismos incapazes de sustentar sua fonte de energia derivada de proteínas (HASTURK et al., 2006, HASTURK et al., 2007).

No que diz respeito à resolvinas da série D são descritos 4 tipos, de RvD1 à RvD4. Eles também são capazes de inibir a infiltração de neutrófilos e estimular a fagocitose macrófagos (SERHAN, 2009). Assim como as resolvinas, as protectinas são mediadores pró

resolutivos do processo inflamatório, sendo sintetizadas pelos tecidos neurais e de células mononucleares do sangue (SERHAN, 2006). Seu nome refere-se à sua função de proteção na inflamação, podendo a mesma atuar em sinergia com RvE1, potencializando as suas ações, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, bloqueando o recrutamento de neutrófilos e linfócitos T e promove sua apoptose (SERHAN et al., 2008).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da suplementação de diferentes fontes de ácidos graxos da série $\omega 3$ e $\omega 6$ na regeneração de lesões cutâneas em *Prochilodus lineatus*.

3.2 Objetivos específicos

- Medir e avaliar a área das lesões através de software fotográfico;
- Avaliar o estado nutricional e parâmetros de desempenho, utilizando os dados biométricos em associação com o consumo das dietas;
- Analisar o perfil imunológico dos juvenis em função das dietas experimentais, através da determinação dos valores hematológicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição do Setor de Piscicultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com sistema de recirculação e controle térmico da água, entre os meses de outubro/2016 a dezembro/2016. Os procedimentos adotados nesse experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFLA, certificado pelo protocolo n° 005/17.

4.1 Dietas experimentais

Os tratamentos consistiram de três dietas semi purificadas isoproteicas (35% de proteína bruta), isoenergéticas (3899 Kcal de energia digestível/Kg de ração) e isolipídicas, variando apenas as fontes de óleos, sendo óleo de peixe (fonte de EPA e DHA), linhaça (fonte de linolênico, C18:3 ω 3) e milho (fonte de linoleico, C18:2 ω 6). As dietas foram processadas e peletizadas no Setor de Piscicultura da UFLA, e sua composição de ingredientes está apresentada na tabela 1.

Tabela 1. Composições das rações experimentais

Composição	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3
Isolado proteico de soja	31,6	31,6	31,6
Amido	33,00	33,00	33,00
Farelo de trigo	13,3	13,3	13,3
Celulose	5,00	5,00	5,00
Gelatina	5,00	5,00	5,00
Suplemento vitamínico mineral ¹	0,50	0,50	0,50
BHT ²	0,02	0,02	0,02
DL-Metionina	0,1	0,1	0,1
Lisina	0,3	0,3	0,3
Vitamina E	0,025	0,025	0,025
Caulim	1,7	1,7	1,7
Fosfato bicálcico	1,9	1,9	1,9
Cloreto de sódio	0,5	0,5	0,5
Fontes de óleo	7,00	7,00	7,00
Óleo de coco	2,00	2,00	2,00
Óleo de peixe	5,00	0,00	0,00
Óleo de linhaça	0,00	5,00	0,00
Óleo de milho	0,00	0,00	5,00
TOTAL	100	100	100

¹Níveis calculados de suplementos vitamínicos e minerais (Mogiana Alimentos S/A – GUABI): Vitamina A, 16.000 UI; Vitamina D, 4.500 UI; Vitamina E, 250 mg; Vitamina K, 30 mg; Vitamina B1, 32 mg; Vitamina B2, 32 mg; Vitamina B12, 32 mcg; Vitamina B6, 32mg; Vitamina C, 42000 mg; Ácido Pantotênico, 80 mg; Niacina, 170 mg; Biotina, 10 mg; Ácido Fólico, 10 mg; Caulim, 2.000 mg; Cobalto, 0,5 mg; Cobre 20 mg; Ferro, 150 mg; Iodo, 1 mg; Manganês, 50 mg; Selênio, 1 mg; Zinco, 150 mg; Aditivo Antioxidante, 150 mg. ²Butil-Hidroxi-tolueno (antioxidante).

Tabela 2. Composição química calculada das dietas experimentais

Composição estimada			
	Peixe	Linhaça	Milho
Proteína Bruta (%)	35	35	35
Energia bruta (kcal/kg)	3899	3899	3899
Extrato etéreo (%)	7,4	7,4	7,4
Fibra Bruta (%)	8,1	8,1	8,1
Lisina	3,12	3,12	3,12
Metionina	0,85	0,85	0,85
Met + Cist	0,82	0,82	0,82
Arginina	4,75	4,75	4,75
16:00	0	0	0
18:2 (n-6)	0,54	0,88	3,14
18:3 (n-3)	0,08	2,67	0,04
n-6/ n-3	0,21	0,27	85,21
EPA	0,385	0	0
DHA	0,49	0	0
EPA/DHA	0,79	0	0
ARA	0,035	0	0

4.2 Delineamento experimental

Foram utilizados 168 juvenis de *Prochilodus lineatus*, sem distinção sexual, distribuídos em 12 tanques com capacidade para 250 litros de água, com 14 peixes cada. Os juvenis foram marcados através da introdução de um microchip, onde cada animal foi considerado uma unidade experimental para avaliação das lesões. Os juvenis foram alimentados com as dietas experimentais duas vezes ao dia *ad libitum* durante 30 dias antes da

confeção das lesões. Após esse período alimentar realizou-se as coletas experimentais. As caixas foram sifonadas diariamente para a retirada dos resíduos de fezes.

Realizou-se delineamento em blocos casualizados composto de três dietas (fontes de óleo) e quatro classes de peso (blocos) por tratamento. Ao final do período alimentar 2 indivíduos de cada tanque foram eutanasiados no tempo 0 e 4 animais no 1º, 7º e 14º dia após a realização da ferida.

4.3 Biometria

O período de adaptação aos tratamentos consistiu de 30 dias antes da realização das feridas cutâneas. No dia da realização da lesão (dia 0) e no 14º dia após a ferida, 12 peixes de cada tratamento foram submetidos à eutanásia por meio de uma concentração de 300 mg L⁻¹ de benzocaína (ROSS e ROSS, 2008).

Nesses a biometria foi efetuada através de paquímetro e balança de precisão, respectivamente, fornecendo medidas individuais de comprimento padrão (CP) e peso corporal dos juvenis.

4.4 Parâmetros de desempenho

No período de alimentar, o consumo de ração foi registrado diariamente em cada caixa, para analisar o desempenho dos peixes, através da avaliação dos seguintes parâmetros:

- Ganho de peso (GP) = peso final – peso inicial;
- Conversão alimentar (CA = consumo de ração/ ganho de peso);
- Taxa de Crescimento Específico (TCE) = [(peso final) - (peso inicial)/ número de dias x 100].

4.5 Índices corporais

Foi realizada a dissecação e mensuração do peso do fígado, intestino, vísceras e gordura visceral para os cálculos dos seguintes índices:

- Índice hepatossômático (IHS) = [(peso do fígado*100) / peso do peixe];
- Índice intestinosômático (IHS) = [(peso do intestino*100) / peso do peixe];

- Índice viscerosomático (IGS) = [(peso das vísceras*100) / peso do peixe];
- Índice de gordura visceral (IGV) = [(peso da gordura visceral*100) / peso do peixe].

4.6 Análise bromatológica

A composição centesimal das dietas experimentais e dos peixes coletados no dia 0 e dia 14, foi realizada no Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia da UFLA.

As carcaças dos peixes passaram pelo processo de pré-secagem em liofilizador à 50°C por 72h. As dietas e os peixes foram homogeneizados e analisados para matéria seca, cinzas, proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE), de acordo com o método padrão.

A matéria seca foi determinada após processo de secagem de 12h a 105°C, até peso estável e as cinzas foram determinadas por incineração dos componentes orgânicos, após 5h a 550°C, utilizando a mufla (LF 0213, JUNG, São Paulo, Brasil).

Detectou-se o teor de proteína bruta ($N \times 6,25$) pelo método de Kjeldahl e o teor de extrato etéreo foi determinado por extração com éter etílico com um sistema de extração Soxhlet (AOAC, 2007).

4.7 Indução da ferida cutânea

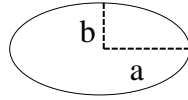
Para a realização das lesões foi adotado inicialmente um protocolo de anestesia. Os juvenis foram mergulhados em uma solução anestésica obtida através da mistura entre álcool e 1% de eugenol (sendo utilizados 3ml desta solução em 1 litro de água).

Após a anestesia, cada peixe foi posicionado e as escamas ao redor da área cirúrgica foram retiradas. Em seguida, com a utilização de um bisturi punh metálico de 5 mm realizou-se a ferida na superfície da pele do lado esquerdo do animal, logo acima da linha lateral.

4.8 Análise da lesão

Para acompanhar o processo de cicatrização, cada animal foi fotografado utilizando câmera fotográfica digital posicionada sobre um tripé. O programa utilizado, Axio Vision LE Release 4.1, foi calibrado possibilitando a caracterização morfológica do material analisado. Todas as análises foram realizadas às cegas. O cálculo da área de superfície da ferida (cm) foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Área} = ab\pi$$



4.9 Análises hematológicas

No dia da realização das lesões (dia 0), 6 peixes sádios e sem as feridas cutâneas de cada tratamento foram utilizados como controle para as análises hematológicas.

No 1º, 7º e 14º dia após a lesão, o sangue foi coletado da veia caudal localizada na região ventral da coluna vertebral, com o auxílio de seringas descartáveis de 3mL contendo EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético). Em seguida, o sangue foi acondicionado em microtubos do tipo Eppendorf.

As extensões sanguíneas foram feitas em duplicatas e coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa (ROSENFELD, 1947) e posteriormente realizou-se a contagem total de leucócitos e trombócitos e a contagem diferencial de leucócitos.

A contagem total de leucócitos e trombócitos realizou-se a partir dos esfregaços sanguíneos pelo método indireto (ISHIKAWA et al., 2008) usando os valores das contagens de eritrócitos, obtidos na câmara de Neubauer, em associação com o número de leucócitos e trombócitos encontrados nas extensões sanguíneas.

Para a contagem manual das hemácias, utilizando a câmara de Neubauer, o sangue foi diluído na proporção de 1:200 em solução salina 0,65% (NaCl) com o auxílio de uma pipeta automática (10 µL de sangue para 1990 µL de solução salina).

4.10 Análise estatística

Os resultados de desempenho foram expressos por médias e erro padrão da média (SEM). Para as avaliações das lesões cada peixe foi considerado uma unidade experimental devido à variação individual da cicatrização em resposta ao tratamento fornecido. As lesões foram avaliadas pela análise de variância de uma via, onde a fonte de variação nos tempos foi a dieta. Para os demais parâmetros adotou-se uma análise de variância de duas vias (tempo x dieta).

Os resultados foram analisados com auxílio do software IBM SPSS Statistics para Windows, Versão 23.0 (Armonk, NY, EUA). As diferenças significativas entre as médias

foram comparadas pelo teste de probabilidade de Tukey HSD, ao nível de significância de 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores relacionados aos parâmetros zootécnicos são mostrados na tabela 3. Não houve diferença significativa nos dados de ganho de peso, comprimento padrão final e taxa de crescimento específico nos diferentes tratamentos. Resultados semelhantes foram registrados por Navarrete et al. (2010) para juvenis de truta alimentados com dietas contendo óleo de tomilho, e por Campagnolo et al.(2013), para tilápias suplementas com óleo de orégano, canela e alecrim. Meer et al. (1997) para tambaqui, Martino et al. (2002) para surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) e Boscolo et al. (2004) para tilápia do Nilo também não observaram diferenças no ganho de peso dos peixes, quando suplementados com diferentes fontes de ácidos graxos. A suplementação dietética com óleo de peixe, canola, girassol e palma também não apresentou diferença na taxa de crescimento específico em tilápias (CHAIW-YEE e WING-KEONG, 2016).

Com relação aos índices corporais, hepatossomático, viscerossomático, intestinosomático e de gordura visceral, não houve influência significativa dos tratamentos a base de óleo de linhaça, milho e peixe (Tabela 3). Esses dados corroboram com os relatados por Losenkann et al. (2008) para jundiá, onde a adição de óleo de canola, de arroz e de soja, a 5 ou 10%, não influenciou tais índices corporais. Ainda para a mesma espécie, Melo et al. (2002) testando óleo de canola, fígado de bacalhau e banha suína, e Martino et al. (2002), testando óleo de milho, soja, linhaça, não observaram diferenças significativas sobre as variáveis de desempenho, índices corporais e taxa de crescimento específico.

Tabela 3. Desempenho zootécnico de curimbas (*Prochilodus lineatus*) alimentadas com rações com diferentes fontes de ácidos graxos.

DESEMPENHO	TRATAMENTO			
	LINHAÇA	MILHO	PEIXE	SEM
Peso inicial	46,6	46,7	46,6	2,89
Peso final	72,8	71,5	70,9	3,06
Ganho de Peso	438,4	429,9	420,4	12,68
Comprimento padrão inicial	12,6	12,6	12,7	0,21
Comprimento padrão final	14,3	14,2	14,2	0,15
Taxa de crescimento específico	1,5	1,4	1,4	0,11
Conversão alimentar	2,5	2,6	2,4	0,05
INDÍCES CORPORAIS				
Víscerosomático	7,8	6,6	6,7	0,22
Hepatosomático	0,6	0,6	0,5	0,03
Intetinossomático	2,5	2,6	2,6	0,13
Gordura Visceral	1,7	1,6	1,6	0,16

SEM (Erro Padrão da Média). As letras nas linhas representam a diferença dentro de cada tratamento.

A análise bromatológica da carcaça dos animais suplementados com diferentes fontes de óleo nas dietas e sua interação com os tempos de coletas não influenciaram ($P > 0,05$) os teores de matéria seca, proteína bruta e extrato etéreo no músculo dos peixes desse experimento (Tabela 4). Com relação a cinzas, o tratamento com linhaça foi maior em ralação aos demais grupos. Normalmente, os animais alimentados com dietas isoprotéicas, isoenergéticas e sem variações nos teores lipídicos totais não apresentam diferenças na composição química básica (MELO et al., 2002; MEURER et al., 2002; MENOYO et al., 2003, REGOST et al., 2003; FRANCIS et al., 2005; HUANG et al., 2007; YILDIRIM-AKSOY et al., 2007; LOSEKANN et al., 2008;). Resultado diferente foi obtido por Ribeiro et al. (2008;2011;2013) e Ferreira et al. (2011), onde o teor de extrato etéreo foi diminuído em peixes alimentados com dieta a base de óleo de linhaça e peixe comparados aos que foram suplementados com óleo de soja, milho e oliva, podendo estar relacionado a maior atividade das enzimas lipogênicas nos animais que receberam rações a base de $\omega 6$. Essa divergência de resultados pode estar relacionada à espécie estudada e a fase de crescimento em que os animais se encontram.

Tabela 4. Composição química (% da matéria seca) de juvenis de *Prochilodus lineatus* alimentados com diferentes fontes de óleo.

	Dia 0				Dia 14			
	Peixe	Linhaça	Milho	SEM	Peixe	Linhaça	Milho	SEM
Matéria Seca	95,29	95,74	95,34	0,20	95,09	95,61	95,35	0,12
Cinzas	19,3a	20,96b	19,02a	0,50	20,21b	20,00b	20,58b	0,20
Lipídeos	10,69	10,65	11,49	0,30	10,38	10,23	10,64	0,31
Proteína	58,74	59,27	61,22	0,70	56,37	57,31	56,57	0,39

	Fontes de variação			Dieta		
	Dieta	Tempo	Interação	Peixe	Linhaça	Milho
Matéria Seca	0,193	0,648	0,939	-	-	-
Cinzas	0,205	0,181	0,018	-	-	-
Lipídeos	0,462	0,238	0,862	-	-	-
Proteína	0,437	0,001	0,358	-	-	-

SEM (Erro Padrão da Média). As letras nas linhas representam a diferença dentro do tempo.

Os animais dos grupos suplementados com óleo de peixe e de linhaça apresentaram uma menor área da ferida no 7º dia após a indução da lesão, com uma redução de 24 e 24,8%, respectivamente, quando comparado aos grupos tratados com óleo de milho. Entretanto, tal diferença não foi observada no 1º dia após a realização da lesão. Esse resultado já era esperado, uma vez que a lesão foi feita utilizando um bisturi punh que possibilitou a padronização das lesões em 5mm (Tabela 5). Resultados semelhantes foram encontrados em experimentos realizados com lesões em diferentes espécies de peixes, os quais induziram feridas cutâneas semelhantes e sem nenhuma alteração macroscópica neste período de coleta (MORAES et al., 2003, TAVARES-DIAS, 2009).

Tabela 5. Medição da área da ferida cirúrgica de curimbas alimentadas com óleo de linhaça, milho e peixe por 30 dias.

TEMPO	ÁREA DA LESÃO (cm)			
	LINHAÇA	MILHO	PEIXE	SEM
1 dia	0,451 ^a	0,464a	0,445 ^a	0,01
7 dias	0,297 ^a	0,421b	0,301 ^a	0,03
14 dias	0	0	0	0

SEM (Erro Padrão da Média). As letras nas linhas representam a diferença dentro de cada tratamento.

Na fase inicial do processo de reparo, os padrões moleculares associados a lesões (DAMPs) liberados pelos tecidos lesionados geram sinais que estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando aumentos locais no fluxo sanguíneo, atração de células de defesa e aumento da permeabilidade vascular, permitindo que enzimas digestivas e

leucócitos inundem os tecidos acometidos (SERHAN, 2006; TIZARD, 2009). A capacidade de geração dessas células pelos órgãos hematopoiéticos varia de acordo com a saúde e nutrição do indivíduo e são responsáveis pelo sucesso ou não da resposta de reparo (LI et al., 2015). Os mediadores pró inflamatórios gerados durante essa fase inicial da inflamação, como as prostaglandinas e leucotrienos, e fatores quimiotáticos, como as células do sistema complemento, principalmente C5a e C5b, são essenciais para o controle do fluxo sanguíneo e da dilatação de vasos, necessários para que os leucócitos sofram firme adesão, diapedese e possam chegar ao local lesionado (SERHAN e SAVILL, 2005). Neste contexto, a utilização de qualquer dos tratamentos aos quais os animais foram submetidos no presente estudo, parece promover o mesmo tipo de resposta.

A análise realizada no 7º dia apresentou evidente resposta positiva na redução da área do ferimento nos animais que receberam o tratamento com óleo de peixe e linhaça (tabela 5). Tal processo provavelmente está relacionado à sequência do processo inflamatório, onde as vias de sinalização para término normal da inflamação ou auto limitação devem ser ativadas. Essas vias atuam através da transcrição de enzimas anti-inflamatórias, advindas dos $\omega 6$ (lipoxinas), bem como dos $\omega 3$ (como resolvinas e protectinas) (SERHAN et al., 2002; MARCHESELLI et al., 2003).

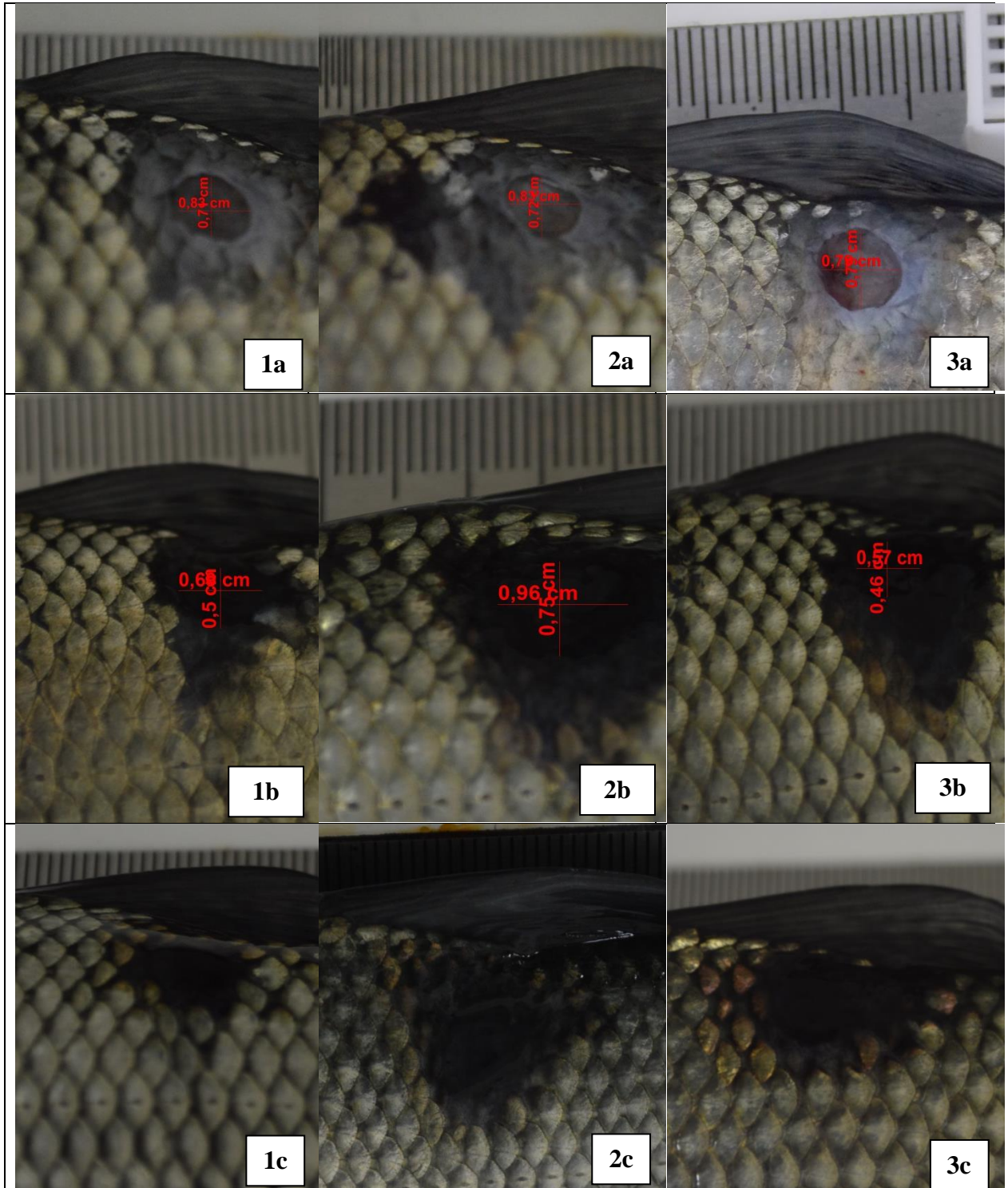


Figura 2. Regeneração da lesão em curimbas suplementadas com fontes de óleos. 1a, 1b, 1c tratamento com óleo de linhaça no dia 1, 7 e 14. 2a,2b, 2c tratamento com óleo de milho no dia 1,7 e 14. 3a, 3b,3c tratamento com óleo de peixe no dia 1, 7 e 14 após a lesão.

A suplementação com óleos de peixe e linhaça atuou de maneira benéfica no fechamento da área da ferida no 7º dia, fato que pode ter ocorrido devido à síntese de mediadores lipídicos anti-inflamatórios e à redução de mediadores pró-inflamatórios, uma vez que os AGs da série ω_3 , encontrados nessas fontes, podem atuar na modulação desse processo (MESQUITA et al., 2011; SILVA et al., 2015). Recentes trabalhos observaram que o acréscimo de óleo de peixe na dieta de ratos, pode modular a atividade enzimática de COX e LOX (SILVA et al., 2015), bem como reduzir a síntese de derivados do ácido araquidônico, como prostaglandina E2 (PGE2), tromboxano A2 (TXA2), prostaciclina (PGI2) e leucotrieno B4 (MESQUITA et al., 2011).

Além disso, sugere-se que a melhor resolução do processo cicatricial, nos grupos em que foram utilizados os óleos de peixe e linhaça na dieta, possam estar correlacionados a atuação de mediadores pró-resolutivos, como as resolvinas e protectinas, sintetizadas pelos AGs ali presentes (SERHAN e SAVILL, 2005; HASTURK et al., 2006, HASTURK et al., 2007; LEVY et al., 2007). Diversos autores já demonstraram a importância da atuação do ω_3 , evidenciando seu papel central na resolução do processo inflamatório, como substrato para a produção de resolvinas e protectinas, em diferentes lesões em modelos experimentais animais, bem como em humanos (IWASAKI et al., 2010; NAQVI et al., 2010; COATES et al., 2016; AZUMA et al., 2017).

Uma vez que o tratamento com óleo de linhaça apresentou resultados semelhantes ao óleo de peixe na regeneração de lesões cutâneas (tabela 5), é possível inferir que a curimba apresenta em organismo as enzimas alongases e dessaturases, sendo capaz de biossintetizar mediadores lipídicos, a partir de seus precursores. Como demonstrado por vários autores, os peixes tropicais de água doce apresentam em seu organismo estas enzimas, tendo a capacidade de converter os ácidos graxos linolênico, em EPA e DHA, e linoleico, em AA (SARGENT et al., 1999a; SEILIEZ et al., 2003; TOCHER et al., 2003; VISENTAINER, 2003; FURUYA et al., 2013).

A completa regeneração epitelial dos peixes foi observada aos 14 dias após a lesão em todos os tratamentos (tabela 5). Esse mecanismo de reparo acelerado em relação aos mamíferos está de acordo com o que já foi evidenciado em outras espécies teleósteas (ANDERSON e ROBERTS, 1975; IGER e ABRAHAM 1990; DUTTA e RAY, 1994; MORAES et al., 2003).

Como já eram esperados, os peixes que foram desafiados com a ferida cutânea apresentaram um diferente padrão de células imunitárias nos diferentes tempos de coleta, mas sem diferença entre os tratamentos, como observado na tabela 6 e 7. A ausência de diferença

hematológica entre os tratamentos, em contraste com o melhor resultado encontrado no tratamento de peixe e linhaça para a regeneração da ferida, demonstra que a quantidade de células que chegam ao local lesionado, pode ser a mesma, o que varia é o modo de atuação daquele tipo celular, que pode ora ser pró-inflamatório e ora pró-resolutivo. Havixbeck e colaboradores (2015) verificaram que os neutrófilos possuíam a capacidade para mediar respostas pró e anti-inflamatória em tempos divergentes.

Na coleta realizada no 1º dia após a lesão, houve um aumento no número de eritrócitos em relação aos peixes controles (tabela 7). Isso acontece devido à vasodilatação decorrente do processo inflamatório, que permite a saída de fluidos e células da corrente sanguínea para o tecido lesionado, o que gera um aumento no percentual de eritrócitos na circulação (TAVARES-DIAS, 2009). A leucocitose observada no 1º dia é resultante da intensa quimiotaxia e diapedese de células imunes para o local da ferida (tabela 7). Esse aumento no número de leucócitos totais é proveniente de uma neutrofilia e monocitose, que levou a uma linfocitopenia. Ghirdelli et al. (2006) e Marinho et al.(2015) também observaram um aumento no número de neutrófilos e monócitos em peixes desafiados. Além disso, foi notada uma trombocitose nessa primeira coleta (tabela 7), o que demonstra o importante papel dos trombócitos na cascata de coagulação e no impedimento do extravasamento sanguíneo. Esse resultado é corroborado por Matushima & Mariano (1996), Afonso et al., (1997) e Vale et al. (2002) que após o estímulos dos peixes com diversos agentes observaram um aumento na contagem de trombócitos.

Tabela 6. Parâmetros hematológicos de curimbas alimentadas com diferentes fontes de óleo.

PARÂMETROS	TRATAMENTO			
	LINHAÇA	MILHO	PEIXE	SEM
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	1.575.472	1.485.172	1.507.636	2,048
Trombócitos($10^3/\mu\text{L}$)	121.450	123.812	133.354	5.910
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	144.052	128.625	121.474	7.088
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	37.309	38.221	31.787	5.217
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	99.469	81.999	80.820	3.614
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	6.692	7.356	7.069	855
Eosinófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	431	472	432	53.5
Basófilo ($10^3/\mu\text{L}$)	0	3	8	0,2

SEM (Erro Padrão da Média).

Tabela 7. Contagem absoluta de parâmetros hematológicos de curimbas com lesão cutânea em diferentes tempos de coleta.

PARÂMETROS	Controle	1 dia	7 dias	14 dias	SEM
Eritrócitos($10^6/\mu\text{L}$)	1.583.333bc	1.825.111c	1.358.889ab	1.402.444ab	18.570
Trombócitos($10^3/\mu\text{L}$)	98.004a	159.616b	113.776ab	128.798ab	5.836
Leucócitos totais ($10^3/\mu\text{L}$)	157.333bc	201.880c	98.602ab	74.580a	7.035
Neutrófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	15.314a	98.986b	7.658a	6.873a	5.183
Linfócitos($10^3/\mu\text{L}$)	137.800b	86.501a	88.173a	62.639a	3.728
Monócitos($10^3/\mu\text{L}$)	3.658a	14.193b	2.225a	4.758a	849,1
Eosinófilos($10^3/\mu\text{L}$)	556a	562a	303a	232a	53,2
Basófilos ($10^3/\mu\text{L}$)	0a	0a	0a	14a	0,1

SEM (Erro Padrão da Média). As letras nas linhas representam a diferença dentro do tempo.

No 7º e 14º dia, como observado na tabela 7, foi constatada uma leucopenia, resultante de um elevado consumo de neutrófilos, devido à sua atuação frente ao processo inflamatório. Durante o processo inflamatório, pode ocorrer um quadro hematológico em que o consumo tecidual suplante a capacidade de produção da hematopoiese, o que caracteriza um quadro de leucopenia (SILVA et al. 2015)

6 CONCLUSÃO

Os tratamentos com óleos de peixe e linhaça influenciaram a regeneração de feridas cutâneas em *Prochilodus lineatus*, sendo eficazes na diminuição da área da lesão.

Sugere-se a suplementação com óleo de linhaça em dietas para peixes tropicais devido a sua maior disponibilidade em relação ao óleo de peixe, o que torna mais viável a utilização nas pisciculturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, p. 499–509, 2003.

ALBANESI, C.; PASTORE, S. Pathobiology of chronic inflammatory skin diseases: interplay between keratinocytes and immune cells as a target for anti-inflammatory drugs. **Current Drug Metabolism**, v. 11, p. 210–227, 2010.

ALLAYEE, H.; ROTH, N.; HODIS, H.N. Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: Implications for nutrigenetics. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, v. 2, p. 140–148, 2009.

ALEXANDER, J.B.; INGRAM, G.A. Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 249–279, 1992.

ANDERSON, C.D.; ROBERT, R.J. A comparison of the effects of temperature on wound healing in a tropical and a temperate teleost . You have full text access to this content. **Journal of Fish Biology**, v. 7, p. 173-182, 1975.

AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 18.ed. Washington: AOAC, p. 3000, 2007.

AZUMA, M.M. et al. Omega 3 Fatty Acids Reduce Bone Resorption While Promoting Bone Generation in Rat Apical. **Journal of Endodontics**, In Press, Corrected Proof, Available online, 2017.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, p. 27-51, 2005.

BANGERT, C.; BRUNNER, P.M.; STINGL, G. Immune functions of the skin. **Clinics in Dermatology**, v. 29, p. 360–376, 2011.

BANNENBERG, G.L. et al. Molecular circuits of resolution: Formation and actions of resolvins and protectins. **The Journal of Immunology**, v. 174, p. 4345-4355, 2005.

BAUM, C. L.; ARPEY, C. J. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. **Dermatologic Surgery**, v. 31, p. 674-686, 2005.

BAYNE, C.J. et al. Immune-relevant (including acute phase) genes identified in the livers of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by means of suppression subtractive hybridization. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 25, p. 205–217, 2001.

BRATTGJERD, S.; EVENSEN, O. A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 55–65, 1996.

BELL, J.G.; SARGENT, J.R.; RAYNARD, R.S. Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 45, p.197–206, 1992.

BELL, J.G.; TOCHER, D.R.; SARGENT, J.R. Effect of supplementation with 20:3(n-6), 20:4(n-6) and 20:5(n-3) on the production of prostaglandins E and F of the 1-, 2- and 3-series in turbot (*Scophthalmus maximus*) brain astroglial cells in primary culture. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1211, p. 335–342, 1994.

BELL, J.G. et al. Effects of different dietary arachidonic acid: docosahexaenoic acid ratios on phospholipid fatty acid compositions and prostaglandin production in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.14, p. 139–151, 1995.

BELL, J.G. et al. Modification of membrane fatty acid composition, eicosanoid production, and phospholipase A activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*) gill and kidney by dietary lipid. **Lipids**, v. 31, p. 1163–1171, 1996.

BELL, J.G. et al. Growth, mortality, tissue histopathology and fatty acid compositions, eicosanoid production and response to stress, in juvenile turbot fed diets rich in gamma-linolenic acid in combination with eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 58, p. 353–364, 1998.

BELL, J. G.; SARGENT, J. R. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 218, p. 491-499, 2003.

BELL, J. G. et al. Replacement of dietary fish oil with increasing levels of linseed oil: Modification of flesh fatty acid compositions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using a fish oil finishing diet. **Lipids**, v. 39, p. 223–232, 2004.

BERBERT, A.A. et al. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis. **Nutrition**, v. 21, p. 131–136, 2005.

BORGES, M.C. et al. Polyunsaturated omega 3 fatty acids and systemic lupus erythematosus: what do we know? **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 54, p. 459–466, 2014.

BOSCOLO, W.R. et al. Desempenho e características de carcaça de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) alimentadas com rações contendo diferentes níveis de gordura. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.26, p.443 - 447, 2004.

BRETT, M.; MÜLLER-NAVARRA, D. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic foodweb processes. **Freshwater Biology**, v. 38, p. 483-499, 1997.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: Potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 433–436, 2003.

- CALDER, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 101–108, 2008.
- CALDER, P.C. The 2008 ESPEN Sir David Cuthbertson lecture: fatty acids and inflammation – from the membrane to the nucleus and from the laboratory bench to the clinic. **Clinical Nutrition**, v. 29, p. 5–12, 2010.
- CALDER, P.C. Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma. **European Journal of Pharmacology**, v. 668, p. 50–58, 2011.
- CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology? **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75, p. 645–662, 2013.
- CAMPAGNOLO, R. et al. Óleos essenciais na alimentação de alevinos de tilápia do Nilo. **Revista Brasileira de Saúde e Prod. Animal**, v.14, p.565-573, 2013.
- CAMPBELL, E.L. et al. Resolvin E1 promotes mucosal surface clearance of neutrophils: a new paradigm for inflammatory resolution. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 3162–3170, 2007.
- CAPONE, S.L.; BAGGA, D.; GLASPY, J.P. Relationship between omega-3 and omega-6 fatty acid ratios and breast cancer. **Nutrition**, v. 13, p. 822–824, 1997.
- CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Victoria: World Fisheries Trust, International Development Research Centre and World Bank, p. 372, 2003.
- CASTILLO-BRICEÑO, P. et al. Collagen regulates the activation of professional phagocytes of the teleost fish gilthead seabream. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 1409–1415, 2009.
- CASTRO, R. et al. T cell diversity and TcR repertoires in teleost fish, **Fish Shellfish Immunology**, v. 31, p. 644–654, 2011.
- CHAIW-YEE, T.; WING-KEONG, N. The implications of substituting dietary fish oil with vegetable oils on the growth performance, fillet fatty acid profile and modulation of the fatty acid elongase, desaturase and oxidation activities of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.* **Aquaculture**, v. 465, p. 311–322, 2016.
- COATES, A.M. et al. Is fish oil effective as an adjunct therapy for non-surgical treatment of periodontitis? **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v.4, p. 13, 2016.
- COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS-CEMIG/CETEC. **Guia Ilustrado de Peixes da Bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte, p. 144, 2000.
- COTRAN, R.V.K.; COLLINS, T. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Saunders, Philadelphia, 2009.
- DALMO, R.; INGEBRIGTSEN, K.; BOGWALD, J. Non-specific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, p. 241–273, 1997.

DELAVALARY, B. M. et al. Macrophages in skin injury and repair. **Immunobiology**, v. 216, p. 753-762, 2011.

DEVALARAJA, R.M. et al. Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, p. 234-244, 2000.

DEZFULIA, B.S. et al. Fish innate immunity against intestinal helminths. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 50, p. 274–287, 2016.

DONG-SOON, I. Omega-3 fatty acids in anti-inflammation (pro-resolution) and GPCRs. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 232–237, 2012.

DRYDEN, S.V.; SHOEMAKER, W.G.; KIM, J.H. Wound Management and Nutrition for Optimal Wound Healing. **Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics**, v. 21, p. 37–47, 2013.

DYEBERG, J. Linolenate-derived polyunsaturated fatty acids and prevention of atherosclerosis. **Nutrition Reviews**, v. 44, p. 125–134, 1986.

DUTTA, M.; RAI, A.K. Pattern of cutaneous wound healing in a live fish *Clarias batrachus* (Clariidae, Pisces.). **Journal of the Indian Fisheries Association**, v. 24, p. 107-113, 1994.

EISSA, A.E. et al. *In vitro* evaluation of the efficacy of hemodialysate (Solcoseryl®) as a wound healing agent in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 1, p. 57–64, 2013.

ELLIOT, D.G. **Chapter 5 – integumentary system (gross functional anatomy), Chapter 17 – integumentary system (microscopic functional anatomy)**. The Laboratory Fish, Academic Press, p. 95–108; 271–306, 2000.

ELLIS, A.E. Leucocytes and related cells in the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Journal of Fish Biology**, v. 8, p. 143–156, 1977.

ELLIS, A.E. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 25, p. 827–839, 2009.

FERREIRA, M. W. et al. Influence of Dietary Oil Sources on Muscle Composition and Plasma Lipoprotein Concentrations in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 42, p. 24-33, 2011.

FISCHER, S. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoid formation in humans. **Advances in Lipid Research**, v. 23, p. 169–198, 1989.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The State of World Fisheries and Aquaculture . FAO, Rome, p. 1-197, 2010.

FRANCIS, D.S. et al. Effects of dietary oil poruce on growth and filet fatty acid composition of Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. **Aquaculture**, v. 253, p. 547-556, 2006.

FUJIMORI, K. et al. Zebrafish and chicken lipocalin-type prostaglandin D synthase homologues: conservation of mammalian gene structure and binding ability for lipophilic molecules, and difference in expression profile and enzyme activity. **Gene**, p. 375, p. 14–25, 2006.

FUJIMOTO, R.Y. et al. Efeito da suplementação alimentar com cromo trivalente em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887), mantido em diferentes densidades de estocagem. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 31, p. 155–162, 2005.

FURNE, M. et al. Cytokine gene expression and prostaglandin production in head kidney leukocytes isolated from Atlantic cod (*Gadus morhua*) added different levels of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid. **Fish Shellfish Immunology**, v. 34, p. 770–777, 2013.

FURUYA, W.M.; HAYASHI, C.; FURUYA, V.R.B. Exigência de proteína para alevino revertido de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.1912-1917, 2000.

FURUYA, W. M. **Espécies nativas: fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas, RS: Ed. ULBRA, p. 59-90, 2001.

FURUYA, V.R.B. et al. Composição proximal e perfil de ácidos graxos do lambari-do-rabo-vermelho (*Astyanax fasciatus*) de diferentes classes de peso. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.14, n. 4, 2013.

GANGA, R. et al. Effect of dietary lipids on plasma fatty acid profiles and prostaglandin and leptin production in gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, p. 410–418, 2005.

GARLET, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: A re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, p. 1349-1363, 2010.

GHIRALDELLI, L. et al. Influence on the Haematological Parameters of Nile Tilapia and Carp Cultured in the State of Santa Catarina, South Brazil. **Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v. 1, p. 270-276, 2006.

GOMEZ-ABELLAN, V. et al. Professional phagocytic granulocyte-derived PGD regulates the resolution of inflammation in fish. **Developmental e Comparative Immunology**, v.58, p. 182-191, 2015.

GRAYFER, L.; BELOSEVIC, M. **Cytokine Regulation of Teleost Inflammatory Responses**. New Advances and Contributions to Fish Biology, Ed. Prof. Hakan Turker, 2012.

HASTURK, H. et al. RvE1 protects from local inflammation and osteoclast mediated bone destruction in periodontitis. **The FASEB Journal**, v. 20, p. 401–403, 2006.

- HASTURK, H. et al. Resolvin E1 regulates inflammation at the cellular and tissue level and restores tissue homeostasis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 7021–7029, 2007.
- HATANAKA, E.; CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 53-58, 2007.
- HAVIXBECK, J.J. et al. Neutrophil contributions to the induction and regulation of the acute inflammatory response in teleost fish. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 99, p. 241-52, 2015.
- HERRAEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 117–126, 1986.
- HOLLAND, M.C.H.; LAMBRIS, J.D. The complement system in teleosts. **Fish Shellfish Immunology**, v. 12, p. 399–420, 2002.
- HRUBEC, T. C.; SMITH, S. A. **Hematology of Fishes**. Schalm's Veterinary Hematology. 6.ed. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing Ltda, p. 994-1003, 2010.
- HUANG, S. S. Y. et al. Effect of dietary canola oil level on the growth performance and fatty acid composition of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. **Aquaculture**, v. 271, p. 420-431, 2007.
- IGER, Y.; ABRAHAM, M. The process of skin healing in experimentally wounded carp. **Journal of Fish Biology**, v. 36, p. 421–437, 1990.
- ISHIKAWA, N. M.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; LOMBARDI, J. V. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *Oreochromis niloticus*. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, p. 54-63, 2008.
- IWASHITA, M.K.P. et al. Influence of vitamina e supplementation on dermal wound healing in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, 2009.
- IWASAKI, M. et al. Longitudinal relationship between dietary ω -3 fatty acids and periodontal disease. **Nutrition**, v. 26, p. 1105-1109, 2010.
- JOO, M.; SADIKOT, R.T. **PGD synthase and PGD2 in immune response. Mediators of Inflammation**, v. 2012, Article ID 503128, 2012.
- KÄMPFER, H. et al. Wound inflammation in diabetic ob/ob mice: functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. **Diabetes**, v. 54, p. 1543–1551, 2005.
- KATZENBACK, B.A.; BELOSEVIC, M. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 33, p. 601–611, 2009.
- KENDALL, A.C.; NICOLAOU, A. Bioactive lipid mediators in skin inflammation and immunity. **Progress in Lipid Research**, v. 52, p. 141-164, 2013.

KENDALL, A.C. et al. Distribution of Bioactive Lipid Mediators in Human Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, p. 1510–1520, 2015.

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

KOBAYASHI, I. et al. Demonstration of hematopoietic stem cells in ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 30, p. 1034–1046, 2006.

KOBAYASHI, I. et al. Isolation of side population cells from ginbuna carp (*Carassius auratus langsdorffii*) kidney hematopoietic tissues. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, p. 696–707, 2007.

KUTYREV, I.A. et al. In vitro effects of prostaglandin E2 on leucocytes from sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) infected and not infected with the cestode *Schistocephalus solidus*. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 41, p. 473–481, 2014.

LEIBOVICH, S.J.; ROSS, R. The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. **The American Journal of Pathology**, v. 78, p. 71–100, 1975.

LEVY, B.D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nature Immunology**, v. 2, p. 612–619, 2001.

LEVY, B.D. et al. Protectin D1 is generated in asthma and dampens airway inflammation and hyperresponsiveness. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 496–502, 2007.

LI, Q. et al. In vitro effects of arachidonic acid on immune functions of head kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). **Aquaculture**, v. 330–333, p. 47–53, 2012.

LI, Q. et al. A comparative study: In vitro effects of EPA and DHA on immune functions of head-kidney macrophages isolated from large yellow croaker (*Larmichthys crocea*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 35, p. 933–940, 2013.

LI, X. et al. Fish oil-supplemented parenteral nutrition could alleviate acute lung injury, modulate immunity, and reduce inflammation in rats with abdominal sepsis. **Nutrition Research**, v. 35, p. 784–791, 2015.

LOBO, B.W. et al. Fish oil attenuates persistent inflammatory pain in rats through modulation of TNF- α and resolvins. **Life Sciences**, v. 152, p. 30-37, 2016.

LOSEKANN, M.E. et al. Alimentação do jundiá com dietas contendo óleos de arroz, canola ou soja. **Ciência Rural**, v.38, p.225-230, 2008.

LOVOLL, M.; DALMO, R.A.; BOGWALD, J. Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 23, p. 721–73, 2007.

- LUCAS, T. et al. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 3964-3977, 2010.
- LUTHRIA, D. L.; MOHAMMED, B. S.; SPRECHER, H. Regulation of the biosynthesis of 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, p. 16020-16025, 1996.
- LUZIA, L.A.; SAMPAIO, G.R.; CASTELLUCCI, C.M.N. The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. **Food Chemistry**, p.1-5, 2003.
- MARCHESELLI, V.L. et al. Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 43807-43817, 2003.
- MARINHO, R.G.B. et al. Respostas hematológicas de *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae) parasitados naturalmente por protozoários e metazoários. **Biota Amazônica**, v. 5, p. 105-108, 2015.
- MARION-LETELLIER, R. et al. Comparison of cytokine modulation by natural peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands with synthetic ligands in intestinal-like Caco-2 cells and human dendritic cells--potential for dietary modulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in intestinal inflammation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 87, p. 939-948, 2008.
- MARTIN C.A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6, importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**. v.19, p.761-770, 2006.
- MARTINO, R.C. et al. Performance and fatty acid composition of surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) fed diets with animal and plant lipids. **Aquaculture**, v.209, p.233 - 246, 2002.
- MARTINS, M.L. et al. Carrageenan induced inflammation in *Piaractus mesopotamicus* (Osteichthyes: Characidae) cultured in Brazil, **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, p. 31-39, 2006.
- MATHIAS, J.R. et al. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. **Journal of Leukocyte Biology**, v.80, p. 1281-1288, 2006.
- MATSUMOTO, H.; IJIMA, N.; KAYAMA, M. The prostaglandin synthesis in marine fish thrombocyte. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 93, p. 397-402, 1989.
- MATUSHIMA, E.R.; MARIANO, M. Kinetics of the inflammatory reaction induced by carragenin in the swim bladder of *Oreochromis niloticus* (Nile Tilapia). **Brazilian Journal of veterinary Research and animal Science**, v. 33, p. 5-10, 1996.
- MEER, M.B.; ZAMORA, J.E.; VERDEGEM, M.C.J. Effect of dietary lipid level on protein utilization and the size and proximate composition of body compartments of *Colossoma*

macropomum (Curvier). **Aquaculture Research**, v.28, p.405-417, 1997.

MELO, J.F.B. et al. Desenvolvimento e composição corporal de alevinos de jundiá (*Rhandia quelen*) alimentados com dietas contendo diferentes fontes de lipídeos. **Ciência Rural**, v.32, p.323-327, 2002.

MELO, R.B. et al. Antiperoxidative properties of oil mixes of high ratio omega-9:omega-6 and low ratio omega-6:omega-3 after molar extraction in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, p. 371–375, 2014.

MENOYO, D.; LOPEZ-BOTE, C.J.; BAUTISTA, J.M. Growth, digestibility and fatty acid utilization in large Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed varying levels of n-3 and saturated fatty acids. **Aquaculture**, v.225, p.295-307, 2003.

MESQUITA, T.R. et al. Anti-inflammatory effect of dietary supplementation with omega-3 fatty acids in rats. **Revista Dor**, v. 12, p. 337-341, 2011.

MEURER, F. et al. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.566-573, 2002.

MIRZA, R.; DIPIETRO, L. A.; KOH, T. J. Selective and specific macrophage ablation is detrimental to wound healing in mice. **The American Journal of Pathology, Bethesda**, v. 175, p. 2454-2462, 2009.

MITTAL, A.K.; DATTA MUNSHI. J.S. On the regeneration and repair of superficial wounds in the skin of *Rita vita* (Ham.) (Bagridae, Pisces). **Acta Anatomica**, v. 88, p. 424–442, 1974.

MONROIG, Ó. et al. Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterisation of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. **Aquaculture**, v. 312, p.145-153, 2011.

MONTERO, A.D. et al. Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**, v. 171, p. 269–278, 1999.

MORAES, F.R.; BECHARA, G.H.; MORAES, J.R. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 47-53, 1987.

MORAES, J.R.E. et al. A suplementação alimentar com vitamina c acelera a evolução do processo cicatricial em *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 29, p 57- 67, 2003.

MORGAN, B.P. et al. Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. **Immunology Letters**, v. 97, p. 171–179, 2005.

MORITOMO, T. et al. Cell culture of clonal ginbuna crucian carp hematopoietic cells: differentiation of cultured cells into erythrocytes in vivo. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, p. 863–869, 2004.

- MURAKAMI, M. et al. Prostaglandin E synthase. **Prostaglandins Other Lipid Mediator**, v. 68–69, p. 383–399, 2002.
- NAKATANI, K. et al. **Ovos e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: Ed. Eduem, p. 378, 2001.
- NAQVI, A.Z. et al. Omega 3 fatty acids and periodontitis in U.S. adults. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, p. 1669–1675, 2010.
- NAVARRETE, P. et al. Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. **Aquaculture Research**, v.41, p.667-678, 2010.
- NESTLE, F.O. et al. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p. 679–691, 2009.
- NICOLAOU, A. Eicosanoids in skin inflammation. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, p. 131–138, 2013.
- NOBRE, M.E.P. et al. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid exert anti-inflammatory and antinociceptive effects in rodents at low doses. *Nutrition Research*, v. 33, p. 422–433, 2013.
- NOVOA, B. et al. In vitro studies on the regulation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophage respiratory burst activity. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 20, p. 207–216, 1996.
- PARAMA, A. et al. Scuticociliate cysteine proteinases modulate turbot leucocyte functions. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 23, p. 945–956, 2007.
- PETERS-GOLDEN, M.; HENDERSON JR, W.R. Leukotrienes. **The New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 1841–1854, 2007.
- PINI, B. et al. Prostaglandin E synthases in zebrafish. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, p. 315–320, 2005.
- PLOUFFE, D.A. et al. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. **Xenotransplantation**, v. 12, p. 266–277, 2005.
- PRESS, C.M.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309–318, 1999.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063–1072, 2008.
- REGOST, C. et al. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*), growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. **Aquaculture**, v. 217, p. 465-482, 2003.

- REITE, O.B.; EVENSEN, O. Inflammatory cells of teleostean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. **Fish Shellfish Immunology**, v. 20, p. 192-208, 2006.
- RIBEIRO, P.A.P. et al. Efeito do uso de óleo na dieta sobre a lipogênese e o perfil lipídico de tilápias-do-nilo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, 2008.
- RIBEIRO, P.A.P. et al. Perfil lipídico e composição química de tilápias nilóticas em diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, p. 199-208, 2011.
- RIBEIRO, P.A.P. et al. Parâmetros metabólicos de pacus submetidos à alimentação com diferentes fontes de óleo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1035-1042, 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.
- ROSS, L.G.; ROSS, B. **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals.** 3rd ed. Oxford: Blackwell Science, p. 236, 2008.
- RUANGSRI, J. et al. Antimicrobial activity in the tissues of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Fish Shellfish Immunology**, v. 28, p. 879-886, 2010.
- RUSSELL, C.D.; SCHWARZE, J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. **Immunology**, v. 141, p. 166-173, 2014.
- SARGENT, J. R.; MCCEVOY, L. A.; BELL, J. G. Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. **Aquaculture**, v. 155, p. 117-127, 1997.
- SARGENT, J. R. et al. Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. **Aquaculture**, v. 179, p. 217-229, 1999a.
- SARGENT, J. R. et al. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 177, p. 191-199, 1999b.
- SARGENT, J. R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G. The lipids. In: HALVER, J. E.; HARDY, R. W. (Ed.). **Fish nutrition.** 3ed. San Diego: Elsevier Science, p. 181-257, 2002.
- SAVILL, J.S. et al. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 83, p. 865-875, 1989.
- SCHARSACK, J.P. et al. Head kidney neutrophils of carp (*Cyprinus carpio* L.) are functionally modulated by the haemoflagellate *Trypanoplasma borreli*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 14, p. 389-403, 2003.
- SCHWAB, J.M. et al. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, v. 447, p. 869-874, 2007.

SECOMBES, C.J. et al. The effect of eicosanoids on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, leucocyte proliferation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 42, p. 367–378, 1994.

SEILIEZ, I. et al. Cloning and nutritional regulation of a Delta6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135, p. 449-460, 2003.

SERHAN, C.N. et al. Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 192, p. 1197-1204, 2000.

SERHAN, C.N. HONG, S; GRONERT, K; COLGAN, S.P; DEVCHAND, P.R; MIRICK, G.; MOUSSIGNAC, R.L. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter pro-inflammation signals. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 1025–1037, 2002.

SERHAN, C.N. et al. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their aspirin-triggered endogenous epimers: an overview of their protective roles in catabasis. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 73, p. 155–172, 2004.

SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1191–1197, 2005.

SERHAN, C.N. Nuevos mediadores químicos en la resolución de la inflamación: resolvinas y protectinas. *Anesthesiology Clinics of North America*, v. 24, p. 341 – 364, 2006.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: Dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 349-61, 2008.

SERHAN C.N. Systems approach to inflammation resolution: Identification of novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 7, p. 44-48, 2009.

SERHAN, C.N.; PETASIS, N.A. Resolvins and protectins in inflammation-resolution. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5922–5943, 2011.

SERHAN, C.N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, p. 92–101, 2014.

SILVA, G. et al. Healthy effect of different proportions of marine ω -3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 1385-1392, 2015.

SILVA, P.H. et al. **Hematologia Laboratorial: Teoria e Procedimentos**. Ed. Artmed (Edição Digital) p.241, 2015.

- SIMMONS, D.L.; BOTTING, R.M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, 56, 387–437, 2004.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407–417, 2001.
- SORDI, R.; LIMA JR, O.M.; ASSREUY, J. Biossíntese e funções das lipoxinas na resolução da inflamação. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.18, p. 7-13, 2012.
- SPRECHER, H. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1486, p. 219-231, 2000.
- TAVAREZ-DIAS, M. **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Ed. Embrapa Amapá, v.1, 2009.
- THRALL, M,A. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.
- TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. Rio de Janeiro: Elsevier, ed. 8, 2009.
- TOCHER, D. R. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. **Reviews in Fisheries Science**, v. 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.
- TOCHER, D. R. Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. **Aquaculture**, v. 449, p. 94–107, 2015.
- TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZIE, S. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. **Inmunologia**, v. 22, p. 277–286, 2003.
- 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 Immunology**, 13, p. 183-98, 2002.
- VEIGAS, J.M. et al. Fish oil delays sensitivity to thermal nociception in mice. **Pharmacological Research**, v.63 p. 377–382, 2011.
- VISENTAINER, J.V. et al. Effect of ration supply time with flaxseed oil on physico-chemical composition and fatty acids of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) heads. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 3, 2003.
- WARR, G.W. The immunoglobulin genes of fish. **Developmental e Comparative Immunology**, v. 19, p. 1–12, 1995.
- WOO, P.T.K.; LEATHERLAND, J.F.; BRUNO, D.W. **Fish Diseases and Disorders**. CABI International: Wallingford, UK, 2011.

YILDIRIM-AKSOY, M. et al. Influence of dietary lipid sources on the growth performance, immune response and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Streptococcus iniae* challenge. **Journal of Applied Aquaculture**, v. 19, p. 29-49, 2007.

ZAPATA, A.G.; CHIBÁ, A.; VARAS, A. Cells and tissues of the immune system of fish. **The Fish Immune System, Organism, Pathogen and Environment, Academic Press**, p. 1–62, 1996.

ZAPATA, A.; AMEMIYA, C.T. Phylogeny of lower vertebrates and their immunological structures. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 248, p. 67–107, 2000.

ZELIKOFF, J.T. Biomarkers of immunotoxicity in fish and other non-mammalian sentinel species: predictive value for mammals? **Toxicology**, v. 129, p. 63–71, 1998.