

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUÍCULTURA

**Marta da Costa Klosterhoff**

**Desenvolvimento ontogênico do rim, timo e baço e expressão  
fenotípica dos receptores CD3 e CD4 em linfócitos do bijupirá  
*Rachycentron canadum***

Rio Grande - RS  
Março, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUÍCULTURA

**Desenvolvimento ontogênico do rim, timo e baço e expressão  
fenotípica dos receptores CD3 e CD4 em linfócitos do bijupirá**

*Rachycentron canadum*

**Marta Klosterhoff**

**Orientador:** Prof. Dr. Luis Alberto Romano

**Co-orientador:** Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de mestre em Aquicultura no Programa de Pós Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande

Rio Grande - RS  
Março, 2012

## **Ata de Aprovação**

## **Ficha Catalográfica**

## Índice:

Resumo Geral.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	9
2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
3- OBJETIVO GERAL: .....	36
ARTIGO EM ANEXO.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>Desenvolvimento ontogênico do rim, timo e baço e expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4 em linfócitos do bijupirá <i>Rachycentron canadum</i> .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Resumo .....	38
<b>1.Introdução .....</b>	<b>40</b>
<b>2.Material e Métodos .....</b>	<b>42</b>
<b>3.Resultado.....</b>	<b>44</b>
<b>4.Discussão .....</b>	<b>47</b>
<b>5.Conclusão .....</b>	<b>52</b>
<b>6.Referências Bibliográficas .....</b>	<b>53</b>
Figuras .....	58

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador e amigo, prof. Romano, pela confiança, pelos ensinamentos, pela oportunidade de trabalhar no laboratório, pelos champanhes, pelas brigas, por contribuir no meu crescimento profissional e principalmente por sua dedicação.

Ao meu co-orientador e amigo prof. Joaber obrigada pela confiança, pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelos conselhos, pelos inúmeros ensinamentos. Obrigada por todo o apoio e atenção.

Ao grupo do LABIPOA, que fizeram parte dos meus primeiros anos na FURG, pelos bons momentos, pela amizade e pelos ensinamentos. Ao Francis, por todo apoio; a Ana Luiza, pelo incentivo a trabalhar no laboratório, a Fabi e Tamy, pelos momentos de descontração e a todos que passaram pelo laboratório nos últimos anos.

Aos meus colegas, Emeline, Fabiane Fürh e Ricardo, que colaboraram na construção deste trabalho, é sempre bom poder contar com pessoas como vocês, obrigada por todo apoio e amizade.

Aos meus colegas e amigos da EMA-FURG, Fabi, Tamyris, Angélica, Janaina, Cintia, Alinca, aos Marcelos (Okamoto e Shei), Gabriel, Ricardo, Leo, Evandro, as minhas companheiras de laboratório, Adriana (Shakira) e Emeline. Enfim, a todos os colegas, não tem como citar todos aqui.

Aos amigos e familiares de Uruguaiana, a todos que mesmo distantes, sempre me apoiaram e torceram por mim, as palavras de carinho e força que serviram de muito incentivo.

Aos meus irmãos, André e Arthur, pelo carinho e preocupação. Em especial ao Arthur e a Anita, que estiveram ao meu lado todo esse tempo, me apoiaram e me deram força nos momentos mais difíceis. A minha sobrinha Duda que sempre me encheu de alegria durante esses anos. Em especial aos meus pais, Méco e Tereza que mesmo de longe, sempre estiveram no meu coração, dedico todas as minhas conquistas a vocês.

Ao Edmundo, que tem me acompanhado nesses últimos meses, me incentivando sempre, obrigada pelo teu carinho e apoio.

Ao curso de pós graduação em aquicultura e cada um dos professores, que durante as disciplinas contribuíram com seus conhecimentos. Ao prof. Sampaio, prof. Tesser e ao Ricardo pela disponibilidade do material biológico utilizado neste estudo, que com certeza foi de grande proveito.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os que de alguma maneira contribuíram com este trabalho.

## RESUMO GERAL

O bijupirá *Rachycentron canadum*, apresenta várias características favoráveis para a aquicultura, como alta taxa de crescimento, bons coeficientes de eficiência alimentar e carne de excelente qualidade, entre outras. No presente estudo foi realizada uma análise do sistema imune do bijupirá através de técnicas de histologia e imunohistoquímica. A ontogenia dos órgãos imunocompetentes (rim anterior, timo e baço) em larvas e juvenis de bijupirá, desde a eclosão até 53 dias após a eclosão (dae), foi realizada através da análise histológica. O rim foi o primeiro órgão linfohematopoiético a aparecer, presente no 1º dia após eclosão (dae) ( $3,8 \pm 0,04\text{mm}$ ), o surgimento do baço foi no 5º dae ( $4,8 \pm 0,2\text{mm}$ ) e no 7º dae ( $5,4 \pm 0,2 \text{ mm}$ ) o timo; conforme análise os órgãos linfóides tornaram-se evidente com o avanço da idade do peixe. Foi possível também estabelecer a presença de receptores específicos de linfócitos através da imunomarcagem com anticorpo monoclonal anti-CD3 e anti-CD4. Foi encontrado no timo os primeiros receptores linfocitários CD3 ao 7º dae com 27%  $\text{mm}^2$  e 99%  $\text{mm}^2$  de tecido tímico aos 53 dae ( $154 \pm 4,6\text{mm}$ ). A expressão fenotípica dos receptores CD3 no rim foi destacada no 8º dae ( $6,5 \pm 0,1\text{mm}$ ) com uma expressão de 10%  $\text{mm}^2$  e 32%  $\text{mm}^2$  de tecido renal aos 53 dae. A imunomarcagem dos receptores linfocitários CD4 foi destacada inicialmente no timo com 7 dae, com 5%  $\text{mm}^2$  e aos 53 dae com 63%  $\text{mm}^2$  de linfócitos imunomarcados com anti-CD4. No Rim, a população de linfócitos T4 foi registrada primeiramente aos 13º dae ( $12,4 \pm 0,7 \text{ mm}$ ) com 9%  $\text{mm}^2$  e aos 53 dae com 28%  $\text{mm}^2$  da população linfocitária CD4 do tecido renal, definindo o desenvolvimento funcional do sistema específico, associada a capacidade da memória imunológica. Também foi possível estabelecer que ocorre uma repovoação de linfócitos T no rim anterior, os linfócitos que migram do rim anterior para o timo e adquirem receptores específicos de células T, retornando ao rim anterior e mantendo suas atividades imunes. O estudo dos mecanismos do sistema imune são importantes para o sucesso de um cultivo, pois as doenças são uma das principais causas de perdas econômicas na aquicultura em todo mundo.

Palavras chaves: sistema imune, ontogenia, imunohistoquímica, órgãos linfóides, bijupirá.

## ABSTRACT

The cobia *Rachycentron canadum* has several desirable traits for aquaculture, most importantly a rapid growth rate, good feed conversion ratio and good flesh quality. In the present study, the immune system of cobia was evaluated through histology and immunohistochemistry. Ontogeny of immunocompetent organs (head kidney, thymus and spleen) in cobia larvae and juveniles from hatching to 53 days after hatching (dah) was histologically described. The first lymphohematopoietic organ to appear was the kidney, at 1 dah ( $3.8 \pm 0.04$  mm), followed by the spleen at 5 dah ( $4.8 \pm 0.2$  mm) and the thymus at 7 dah ( $5.4 \pm 0.2$  mm); the lymphoid organs became evident as the fish grew older. It was also possible to establish the presence of specific lymphocyte receptors through immunolabeling with the monoclonal antibodies anti-CD3 and anti-CD4. The first evidence of CD3 lymphocyte receptors was found at 7 dah with 27% mm<sup>2</sup> of thymic tissue and at 8 dah ( $6.5 \pm 0.1$  mm) in the kidney, expressed in 10% of the kidney tissue. Initially, 5% mm<sup>2</sup> of lymphocytes with CD4 lymphocyte receptors were initially immunolabeled in the thymus. In the kidney, T4 lymphocyte population was registered to be present at 13 dah ( $12.4 \pm 0.7$  mm) with 9% mm<sup>2</sup>, defining the functional development of the specific system, associated to immunological memory capacity. It was also possible to establish a repopulation of T lymphocytes in the head kidney; lymphocytes migrate from the head kidney to the thymus and acquire specific T-cell receptors, returning to the head kidney and maintaining their immune activities. The knowledge about the immune system mechanisms is important for farming activities, as diseases are the major causes of economic losses in global aquaculture.

Key words: immune system, ontogeny, immunohistochemistry, lymphoid organs, cobia



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Aquicultura

No Brasil, segundo os dados da FAO, entre o ano 1999 e 2000, enquanto a aquicultura mundial cresceu em 9%, no Brasil cresceu 36%. Atualmente a aquicultura é praticada em todos os estados do Brasil, com alto potencial de crescimento e desenvolvimento (FAO, 2010).

Destacando a aquicultura do bijupirá, sua criação teve início nos anos 1970 nos EUA, com tentativas de criação em laboratórios, em 1990 em Taiwan obtiveram a primeira desova em cativeiro (Liao *et al.* 2004; Kaiser & Holt, 2005). Desde 1994, desovas vêm sendo obtidas a partir de reprodutores produzidos em cativeiros (Liao *et al.* 2004). A produção mundial de bijupirá em 2009 foi estimada em 31.926 t (FAO, 2011) e destacaram-se como principais produtores China e Taiwan. Embora não conste nas estatísticas da FAO, o Vietnã teve produção estimada de 1.500 t em 2008 (Nhu *et al.* 2011). Existem também relatos da criação desta espécie nos Estados Unidos (Weirich *et al.* 2004), México (Segovia-Valle *et al.* 2006), Ilhas Réunion, Japão, Indonésia (Liao & Leño, 2007), Porto Rico, Tailândia, Irã, República Dominicana, Bahamas, Martinica (Benetti *et al.* 2008), Emirados Árabes Unidos (Yousif *et al.* 2009), Colômbia, Singapura, Belize (FAO, 2011) e Índia (Gopakumar *et al.* 2011).

No Brasil, o bijupirá está presente em todo o litoral, mas é mais abundante em águas tropicais (Figueiredo & Menezes, 1980), no entanto, atualmente não há produção comercial da espécie, o cultivo de bijupirá está iniciando no Brasil e há grande interesse em sua criação, inclusive com iniciativas de empresas privadas e apoio governamental. Várias pesquisas em desenvolvimento sobre a espécie sugerem um potencial para a aquicultura brasileira (Sanchez 2007; Benetti *et al.* 2008).

### 1.2. Bijupirá

Rachycentridae é monotípica e a única espécie é *Rachycentron canadum*, conhecida popularmente como bijupirá, beijupirá ou cobia. São peixes pelágicos migratórios e amplamente distribuídos em águas tropicais e subtropicais do oceano

Atlântico, do Oceano Índico e com exceção da porção leste do oceano Pacífico (Shaffer & Nakamura, 1989; Brown-Peterson *et al.* 2001), no Brasil, o bijupirá está presente em todo o litoral, mas é mais abundante em águas tropicais (Figueiredo & Menezes, 1980).

O bijupirá é uma espécie de hábito carnívoro, predador de peixes, crustáceos e lulas (Kaiser & Holt, 2005). O desempenho do bijupirá criado em pH 8 ou 7 é superior a dos peixes criados em pH mais reduzido. O crescimento e a eficiência de conversão alimentar são comprometidos quando os juvenis de bijupirá são criados em sistemas de recirculação de água com pH 6 ou 5 (Sampaio *et al.* 2008). Temperaturas entre 27 e 29°C são as mais adequadas para otimizar o crescimento e a eficiência alimentar de juvenis de bijupirá (Sun *et al.* 2006).

Apresentam fecundação externa. Em regiões subtropicais a reprodução ocorre nos meses de verão, enquanto em latitudes mais baixas o período de desova pode ser mais estendido (Shaffer & Nakamura, 1989). Os machos atingem a maturidade com dois anos de vida (65 cm) e as fêmeas, com três anos de vida (80cm), mas já foram encontrados indivíduos mais precoces (Franks & Brown-Peterson, 2002). A desova natural do bijupirá é controlada pelo fotoperíodo e pela temperatura da água. Arnold *et al.* (2002) e Benetti *et al.* (2008) obtiveram as primeiras desovas quando a temperatura ultrapassou os 24°C e o fotoperíodo atingiu 13 horas de luz por dia. Temperaturas acima de 28°C parecem inibir a desova de bijupirá. A temperatura não deve ser inferior a 19°C no inverno e deve haver uma elevação de aproximadamente 1°C por mês, até que no verão a temperatura esteja entre 26 e 28°C (Kaiser & Holt, 2005; Sampaio *et al.* 2010).

Esta espécie apresenta várias características favoráveis para a aquicultura, principalmente uma alta taxa de crescimento (Liao & Leño 2007), pois é capaz de alcançar um peso médio entre de 4 - 6 kg em um ano (Arnold *et al.* 2002; Benetti *et al.* 2008), e entre 8 a 10 kg em 16 meses (Liao *et al.*, 2004), esses peixes atingem até 2 m de comprimento e 68 kg (Shaffer; Nakamura, 1989). Além disso, o bijupirá apresenta bons coeficientes de eficiência alimentar (Webb *et al.* 2007), adaptabilidade ao confinamento e aceitação de dietas comercialmente disponíveis (Chou *et al.* 2001; Craig *et al.* 2006). Tem capacidade de reprodução em cativeiro (Faulk & Holt 2006), com fecundidade elevada (Faulk & Holt 2008), alta taxa de sobrevivência pós-eclosão (Liao *et al.* 2004; Faulk *et al.* 2007), boa produção de larvas (Benetti *et al.* 2008), a

capacidade para resistir a variações de salinidade (Resley *et al.* 2006) e carne de excelente qualidade (Liao *et al.* 2004; Craig *et al.* 2006; Liao & Leão 2007).

Devido a estas características, a produção de bijupirá tem crescido desde 1990, especialmente no Sudeste e Leste da Ásia (especialmente China e Taiwan). Sua produção normalmente utiliza tanques-redes em mar aberto e também sistemas intensivos de recirculação, e outra importante alternativa é a utilização de viveiros estuarinos (Benetti *et al.* 2008).

Por outro lado, como o uso desta espécie é relativamente novo na aquicultura, ainda existe pouco conhecimento sobre alguns aspectos da fisiologia da espécie, como a caracterização das células, tecidos e órgãos que participam na resposta imune e aspectos relacionados com a ontogenia deste sistema, sendo necessários mais estudos sobre estes aspectos (Holt *et al.* 2007).

### **1.3. Sistema imunológico dos peixes teleósteos**

O sistema imune pode ser definido como um conjunto de órgãos, tecidos, células e moléculas capazes de reconhecer o que é próprio e recusar o que não é próprio. O sistema imune pode ser classificado do ponto de vista funcional em duas classes: o sistema imune inato, inespecífico ou natural e o sistema imune adaptativo, específico ou adquirido (Abbas 2007).

#### **1.3.1. O sistema imune inespecífico ou inato**

O sistema imune inespecífico é denominado antígeno independente, ou seja, qualquer que seja o antígeno a resposta será semelhante e ao longo do tempo a presença do mesmo antígeno não altera a resposta, ou seja, não há memória imunológica. Este sistema atua como primeira linha de defesa contra a presença de um agente patógeno e no controle de muitas infecções sem recorrer ao sistema específico (Levraud & Boudino, 2009).

Este sistema é composto por barreiras físicas e mecânicas, como a pele, cuja função é impedir a entrada de agentes patógenos. A pele é resistente e produz abundante muco que contém lisosima, enzima bactericida, mais encontrado nas mucosas. Em segundo lugar, o tecido sanguíneo fornece células circulantes no sangue periférico, como granulócitos, monócitos e trombócitos de importância no estabelecimento do

processo inflamatório. No plasma também se encontram substâncias que são de interesse na resposta imune inespecífica para estimular e ativar a fagocitose de complexos imunes, gerar lise direta do patógeno e desencadear o processo inflamatório, quando a gravidade do ataque exigir. O mecanismo de ação do sistema imune, conforme o esquema, mostra a possibilidade do patógeno não ser controlado, transferindo essa ação para o sistema específico (Romano 2010) (fig1).

No entanto, o sistema imune inespecífico está composto por fatores celulares (células do sangue) células destinadas a fagocitar e apresentar o antígeno ao sistema imune específico além dos fatores humorais (Magnadóttir 2006; Romano 2010). Em alguns casos, quando o material a ser fagocitado é grande, formam-se células gigantes multinucleadas (Klosterhoff & Romano 2012).

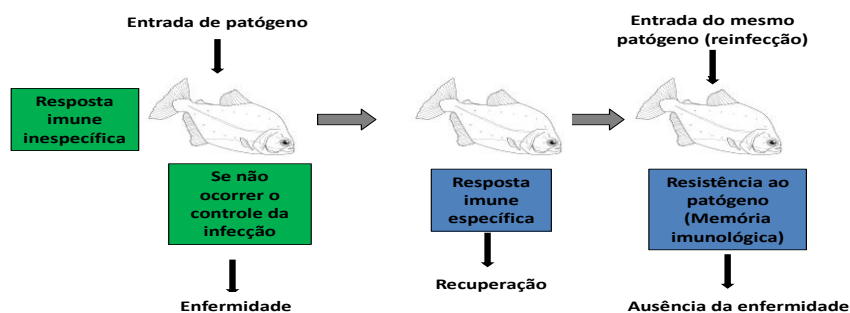


Figura 1: Mecanismo de ação da imunidade inespecífica e específica: quando um agente patógeno entra no organismo começa a resposta inespecífica, o patógeno é destruído e o animal se recupera, se não pode ser controlado, transfere-se a informação ao sistema específico, que reage (imunidade celular e humoral) gerando uma resposta eficaz, destruindo o patógeno e a memória imunológica é gerada bloqueando qualquer futura tentativa de entrada do mesmo patógeno (Romano 2010).

### 1.3.2. Células do sistema Imune inato:

As principais células que participam na resposta inflamatória inespecífica são os macrófagos, os quais fagocitam substâncias estranhas abióticas e bióticas como diferentes patógenos. Células apresentadoras de antígenos (APC) também estão envolvidas na resposta imune específica, de tal forma que podem fornecer uma ponte

entre a resposta imune inespecífica e a específica. Em última análise, essas células tem uma heterogeneidade funcional que vai além de uma simples fagocitose (Romano 2010). Sua diferenciação e origem no rim anterior dos peixes ainda não estão esclarecidas. Encontram-se em trânsito entre os tecidos centrais hematopoiéticos, como o rim anterior onde se diferenciam em diversas células fagocíticas, tais como macrófagos chamados fixos ou histiócitos. Durante os processos inflamatórios estas células abandonam os vasos sanguíneos no local afetado, transformam-se em histiócitos e fagocitam bactérias e restos celulares. Os monócitos-macrófagos também são células apresentadoras de antígenos (Romano 2010; Male et al. 2006).

Os macrófagos incorporados nos tecidos distribuem-se estrategicamente por todo o corpo constituindo o sistema fagocitário mononuclear (SFM). Mas o enfoque das células histiocíticas implica considerar inicialmente sua enorme capacidade funcional para enquadrar adequadamente os caracteres morfológicos e histoquímicos dos mesmos (Male *et al.* 2006).

O conhecimento atual sobre os macrófagos confirma seu papel central em todos os tecidos como células de defesa e interação. O papel de defesa é o mais conhecido; a função de interação, isto é, ação exercida reciprocamente entre dois ou mais agentes, forças, funções, permite destacar as atividades que vão além de avaliar a atividade fagocitária, estendendo-se até as suas coparticipações permanentes com outras células (Ferguson 1989). Nos peixes, este sistema está totalmente desenvolvido, nos quais encontram-se células com capacidade fagocitária circulando no sangue e em outros tecidos (Tab.1).

Tabela 1: Sistema fagocitário mononuclear em teleósteos (Romano, 2010).

<b>Tipos de células</b>	<b>Local do tecido</b>
Macrófago fixo (histiócito)	Tecido conjuntivo de todo o organismo
Células semelhantes às células de Kupffer de mamíferos	Fígado
Melanomacrófagos	Baço, rim, fígado
Célula granular eosinófila (CGE)	Vários tecidos
Microglia	Sistema nervoso central

A distribuição dos macrófagos em todo organismo garante a retirada de elementos e/ou células estranhas e também produtos próprios de envelhecimento celular. Nos peixes existem macrófagos carregados de pigmentos denominados melanomacrófagos, produzidos no rim, baço e em algumas espécies, no fígado. Da mesma forma, sua presença é abundante em tecidos inflamados (Hernandez & Zapata 1986, Agius 2003). Os melanomacrófagos podem se apresentar como células isoladas como observado em teleósteos inferiores, como em salmonídeos, ou como grupos celulares formando centros melanomacrofágicos (CMM) como na maioria dos teleósteos superiores, como os ciprinídeos (Hernandez & Zapata 1986).

As características da coloração dos melanomacrófagos estão relacionadas com a presença dos pigmentos, formados pelo acúmulo de ferro, melanina, material amorfo fagocitado, e eventualmente por pigmento ceróide (Agius & Agbede 1983). A circulação e ativação de linfócitos pelos CMM, bem como o aumento de seu número em várias condições patológicas indicam o importante papel que estas células desempenham no mecanismo de defesa dos peixes. Estes CMM podem representar os centros germinais mais primitivos, homólogos a de aves e mamíferos (Agius 1979, Anderson 1990, Macchi 1992).

As células granulares eosinofílicas (CGE) também são importantes na resposta imune inespecífica de peixes. As CGE são células mononucleares que contêm abundantes e proeminentes grânulos eosinofílicos. As características histoquímicas dessas células e suas associações com certas doenças sugerem que são semelhantes aos mastócitos dos mamíferos (Lucena 1990; Matsuyam 2002).

### **1.3.3. Fatores bioquímicos plasmáticos e tissulares:**

Existem vários tipos diferentes de substâncias envolvidas direta ou indiretamente na fagocitose. Algumas geram opsonização de microorganismos ou procuram impedir a replicação viral e outras que participam da resposta inflamatória que é uma resposta inespecífica inicial completa frente a um patógeno. Pesquisas recentes, em vários animais, incluindo peixes, relatam peptídeos antimicrobianos endógenos que são

importantes na resposta imune inespecífica (Romano 2008). Os mais conhecidos são as lisozimas.

A lisozima é uma enzima amplamente distribuída entre os seres vivos. Sua ação catalítica consiste em romper a ligação glicosídica característica dos peptidoglicanos bacterianos, cujo dissacarídeo constituído é N-acetil glucosamina e N-acetil murâmico. A atividade da lisozima no muco pode induzir resistência nos peixes expostos a agentes infecciosos (Park *et al.* 1998, Patrzykat *et al.* 2001).

Sistema do complemento: O sistema do complemento é um componente importante do sistema imune inato e está constituído por cerca de 35 diferentes proteínas. Os estudos com peixes sugerem que esses animais tem um sistema com vias de ativação similar a dos mamíferos (Holland & Lambris 2002). Informação sobre as proteínas do sistema de complemento, as proteínas reguladoras e receptores do complemento dos peixes ainda não estão totalmente clara. Não está certo se todas as funções do complemento, que também foram identificadas em mamíferos, ocorrem nos peixes. No entanto, tem sido demonstrado claramente que o sistema de complemento dos peixes produz tanto lise direta quanto indireta de células estranhas e que são capazes de estimular a fagocitose e a opsonização (Holland & Lambris 2002).

Proteína C reativa (CRP): Há muito tempo sabe-se que a CRP em mamíferos participa da fase aguda da resposta inflamatória. Esta proteína se liga a várias proteínas da parede de micro-organismos, no qual cumpre funções de opsonização (Povoa 2002). Tem sido demonstrada em peixes que esta proteína provoca a precipitação de uma variedade de moléculas contendo carboidratos e ésteres fosforilados, presentes em fungos, parasitos e bactérias (Baldo & Fletcher 1973). Uma diferença interessante em relação à CRP dos mamíferos é que, nos peixes, é um constituinte considerado normal e constante do plasma, comportando-se como um elemento defensivo contra qualquer micro-organismo (Fletcher *et al.* 1981).

A CRP não se eleva apenas pela presença de noxas biológicas como os micro-organismos. Tem sido demonstrada modificações de níveis de CRP no soro de trutas após a exposição ao formol e permanganato de potássio, de tal forma que a determinação dos níveis desta proteína pode ser usada como um bioindicador de estado de saúde dos peixes (Kodama *et al.* 2004).

#### **1.3.4. Mediadores químicos da inflamação:**

Histamina: Possivelmente o mais conhecido na reação inflamatória. A histamina foi reconhecida em diferentes espécies de peixes, mostrando que regula o processo de explosão respiratória e desempenha um papel importante no controle da resposta inflamatória (Park *et al.* 1998, Rose *et al.* 1998). Células homólogas aos mastócitos de mamíferos, as CGE, parecem conter histamina (Romano 2008).

Serotonina: A serotonina (5 hidroxitriptamina) é o segundo importante mediador vasoativo na resposta inflamatória. Nos peixes, sua função parece ser similar à dos mamíferos, nos quais está associada a fenômenos de estresse. Durante o estresse, os níveis de serotonina na circulação periférica influenciam vários sistemas fisiológicos, incluindo o sistema imune, de modo que nesses animais essa substância pode ser considerada como imunomoduladora (Naim *et al.* 1997). Estudos histoquímicos têm revelado a presença de serotonina nas brânquias (Dunel-Erb *et al.* 1989), encontrado em dois tipos de células branquiais; nas células neuroepiteliais, que se encontram entre as células epiteliais das lamelas branquiais e nas células e fibras nervosas que inervam a artéria eferente da lamela branquial. (Dunel-Erb *et al.* 1989; Bailly *et al.* 1989).

Cininas: As cininas formam uma família de peptídeos produzidos em fluidos corporais e tecidos durante a inflamação. Os mais estudados são as bradicininas e as calidinas, que são sintetizados, através da ação da enzima calicreína, a partir de moléculas precursoras denominadas cininogênios (Yoshio 2001). A bradicinina foi encontrada em várias espécies de peixes, mas suas funções ainda não estão claramente definidas. As brânquias e o rim têm calicreína com imunorreatividade de bradicinina que demonstram que os peixes possuem elementos do sistema de cininas, incluindo calicreína assim como a atividade enzimática de cininase II (Singh *et al.* 2007).

#### **1.3.5. Sistema imune adaptativo ou específico**

O sistema imune específico ou adaptativo é também denominado antígeno dependente, ou seja, gera uma resposta específica contra uma região específica do patógeno, conhecido por antígenos (Abbas *et al.* 2007). Esse sistema de defesa consiste na proliferação de linfócitos que produzem anticorpos ou células citotóxicas específicas para cada antígeno, com o desenvolvimento da memória imunológica (Trichet 2010),



permitindo a produção de vacinas para proteger humanos e animais contra agentes infecciosos. (Marsden *et al.* 1996).

A individualidade imunológica é marcada pelo complexo principal de histocompatibilidade, o qual demonstra que o indivíduo é único. Por isso há sempre uma tendência de rejeitar tecidos implantados a partir de uma espécie diferente (xenogênico) e de indivíduo da mesma espécie (alogênico). Durante a vida de um indivíduo e ao longo do desenvolvimento evolutivo, este complexo sistema imunológico permitiu resistir à ação deletéria de vários noxas (Cushing 1975; Cooper 2003; Beckman 2005).

A imunidade específica é subdividida em dois padrões de resposta, a imunidade específica humoral e a imunidade específica celular (Rubio-Godoy 2010), e são representadas respectivamente pelos linfócitos B e T. Durante a ontogenia do sistema imune, os linfócitos que migram do rim anterior ou pronefron para o timo adquirem receptores específicos de células T (timo-dependente). Em peixes, os linfócitos B adquirem seus receptores específicos, aparentemente no pronefron (Nielsen & Esteve-Gassent 2006).

Alguns antígenos estimulam a imunidade humoral produzida por linfócitos B e estas células sintetizam um tipo de imunoglobulina denominada M (IgM) que circula pelo soro sanguíneo, enquanto outros antígenos estimulam a imunidade celular ou timo dependente. As células T não produzem anticorpos circulantes, apenas células que acabam produzindo células T citotóxicas (CD8) que neutraliza o antígeno (Stoskopf 1993, Cain *et al.* 2002).

### **1.3.6. Imunidade Específica Humoral**

A imunidade humoral funciona através de moléculas presentes no sangue e nas secreções das mucosas. Essas moléculas, os anticorpos ou imunoglobulinas (Ig), mais especificamente a IgM, única imunoglobulina produzida por peixes, são produzidas por linfócitos B e reconhecem antígenos, neutralizam a patogenicidade dos microrganismos e os preparam para serem eliminados por diversos mecanismos efetores. A capacidade das imunoglobulinas de união com antígenos solúveis permite a formação de um complexo antígeno-anticorpo que precipita e aglutina e o mecanismo da fagocitose elimina o antígeno. (Rubio-Godoy 2010).

### **1.3.7. Imunidade Específica Celular**

A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T (timo-dependentes) e B (bursa-dependente). Esses tipos celulares linfóides têm a função de defender o organismo contra infecções que não são passíveis de controle apenas com a imunidade humoral. Alguns microorganismos intracelulares, como vírus e algumas bactérias, sobrevivem e proliferam no interior dos fagócitos e outras células do hospedeiro, onde estão protegidas dos anticorpos. A defesa contra tais infecções cabe à imunidade celular, que promove o reconhecimento e a destruição das células infectadas para eliminar os reservatórios de infecção. Os linfócitos B representam as únicas células capazes de produzir e secretar anticorpos. Eles reconhecem antígenos extracelulares, incluindo aqueles que estão na superfície celular, e se diferenciam em células secretoras de anticorpos ou imunoglobulinas. Em função dos linfócitos T serem objetos deste estudo, a seguir será apresentado algumas de suas características (Rombout et al 2005; Rubio-Godoy 2010).

### **1.3.8. Linfócitos T**

Os linfócitos T reconhecem os antígenos intracelulares destruindo-os ou destruindo a célula infectada. Seus receptores de antígenos são moléculas presentes na membrana. Esses linfócitos apresentam uma especificidade restrita para antígenos; reconhecem apenas peptídeos antigênicos ligados a proteínas do hospedeiro que são codificadas pelos genes do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) que se expressam nas superfícies de outras células (Maisey *et al.* 2010). Dessa forma os linfócitos T reconhecem e respondem a antígenos ligados a superfície celular e não a antígenos solúveis. Todos os linfócitos adquirem o receptor CD3 ao chegar ao timo, logo são divididos de acordo com sua funcionalidade em duas subpopulações linfocitárias principais: os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ou auxiliares e os linfócitos T CD8<sup>+</sup> ou citotóxicos. Esses dois grupos de linfócitos expressam em sua membrana o receptor de antígeno chamado receptor  $\alpha\beta$ , conhecido também como receptor de célula T (TCR). O receptor TCR é um heterodímero, formado por duas cadeias polipeptídicas transmembrana, ligadas por pontes de dissulfeto. Cada cadeia de TCR é codificada por múltiplos segmentos gênicos que sofreram recombinação somática durante a maturação

dos linfócitos T (Zhu & Paul 2008). Esse processo é chamado de recombinação V(D)J, pois ocorre através do rearranjo de vários genes da região variável (V), com genes de diversidade (D) e/ou junção (J) em cada linfócito, assim gerando um novo exon rearranjado para cada gene do receptor de antígenos (Abbas *et al.* 2007).

Juntamente com o TCR nos linfócitos T estão as proteínas CD3 e CD247, que são receptores de membrana que estão presentes em todos os linfócitos que tem sua maturação e diferenciação no timo e estão envolvidas genericamente no mecanismo de transdução de sinal. Essas proteínas juntamente com o TCR na membrana celular formam o complexo TCR e são necessárias para a expressão do TCR, transporte deste receptor e transdução de sinal (Fig. 2A-B) (Clevers *et al.* 1988; Klausner *et al.* 1990).

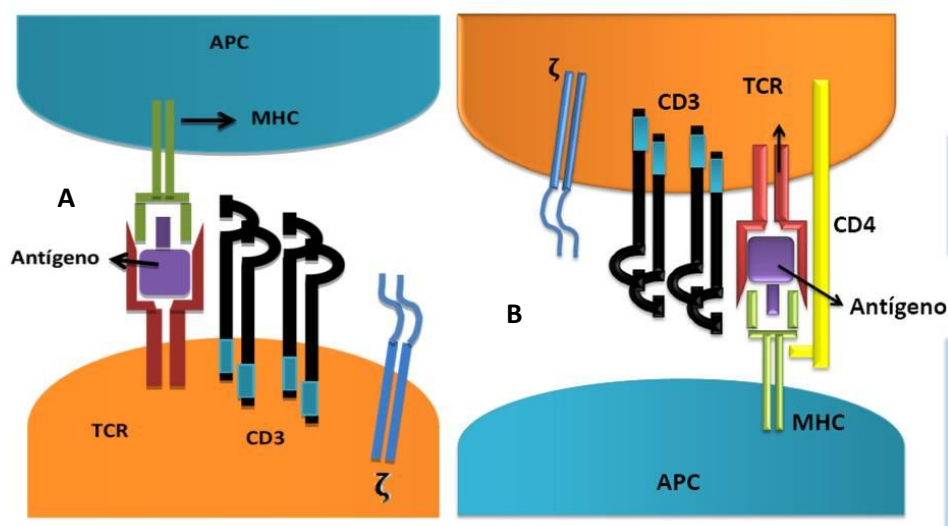


Figura 2: Complexo TCR no linfócito T. **A:** As APC têm glicoproteínas tipo II de MHC, os receptores CD3 ocorrem em linfócitos T e fazem parte do complexo TCR, reconhecem o antígeno, mas não participam no processamento do antígeno. **B:** Os receptores CD4 ocorrem em linfócitos T auxiliares e fazem parte do complexo TCR. Além de reconhecer o antígeno, utilizam o epitopo para produzir um clone de linfócitos destinados somente a bloquear esse antígeno. CD4 são proteínas das células T que se ligam as regiões das moléculas do MHC que participam da transdução de sinal. (Batista, 2011)

Dessa forma, independente do linfócito pertencer a subpopulação CD4 ou CD8 ele apresentará o complexo TCR em sua membrana celular. As subpopulações de linfócitos CD4 e CD8 são diferentes por possuírem além do complexo TCR, glicoproteínas na membrana específica, que definem a funcionalidade de cada população. Essas glicoproteínas ligam-se a regiões não polimórficas das moléculas do

MHC e transduzem os sinais pelo complexo TCR durante a ativação das células T. A principal função dos receptores CD4 e CD8 é a transdução de sinais no momento de reconhecimento do antígeno, além também de reforçar a ligação dos linfócitos T com as APCs. O CD4 é expresso como um monômero na superfície das células T, já o CD8 é expresso como um heterodímero constituído de duas cadeias CD8 $\alpha$  e CD8 $\beta$ . Os linfócitos CD4<sup>+</sup> estão principalmente envolvidos na defesa do organismo contra agentes extracelulares que foram englobados pelos macrófagos bem como na produção de citocinas, enquanto os linfócitos CD8<sup>+</sup> estão mais relacionados ao combate de infecções em que o micro-organismo encontra-se no meio intracelular (Bevan 2004; Zhu & Paul 2008). O linfócito T4 tem um papel fundamental em ativar todo o sistema imune e atua como uma ponte entre a imunidade inespecífica e específica (Fig 3) (Romano 2010).

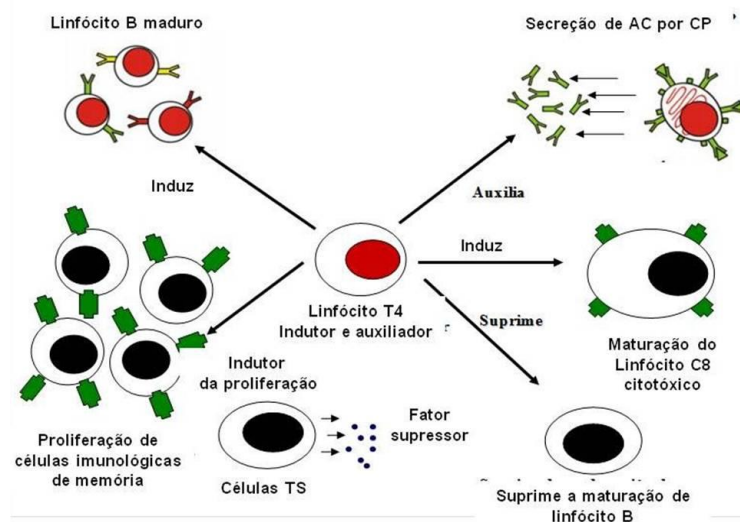


Figura 3: Papel central que o linfócito T4 realiza na ativação da resposta do sistema imune específico, tanto humoral como celular (Romano, 2010).

#### 1.4. Órgãos Linfóides

Os órgãos linfóides são classificados em órgãos primários e secundários, sendo o rim e o timo órgãos primários; o baço, o tecido linfóide associado ao intestino, conhecido como GALT (Gut-associated lymphoid tissue), as brânquias e a pele são órgãos secundários (Press & Evensen 1999). O timo em peixes teleósteos apresenta similaridade estrutural e funcional com o de mamíferos. Em vertebrados mandibulados, os linfócitos B e T, com seus diversos receptores para antígenos, são os tipos celulares

fundamentais para a imunidade adaptativa e o timo é o órgão fundamental para diferenciação e maturação da linhagem linfóide T. Em teleósteos o timo permanece intimamente associado com a câmara branquial, com o epitélio da faringe formando sua borda anterior (Zapata *et al.* 1996) (Fig 4).

Estruturas conhecida como corpúsculos de Hassall são encontradas na medula do timo de mamíferos, formados por células linfo epiteliais, unidas por desmossomos. Essas células, principalmente as mais centrais, podem degenerar e morrer, deixando restos celulares que podem calcificar. Contudo, desconhece-se com clareza as suas funções (Watanabe *et al.* 2005). Esta estrutura ainda não encontra-se descrita em timo de teleósteos (Hibiya 1982; Genten *et al.* 2009). Porém outros autores descrevem estruturas similares a corpúsculo de Hassall em peixes, como na truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Ellsaesser *et al.* 1988; Chilmonczyk 1992).

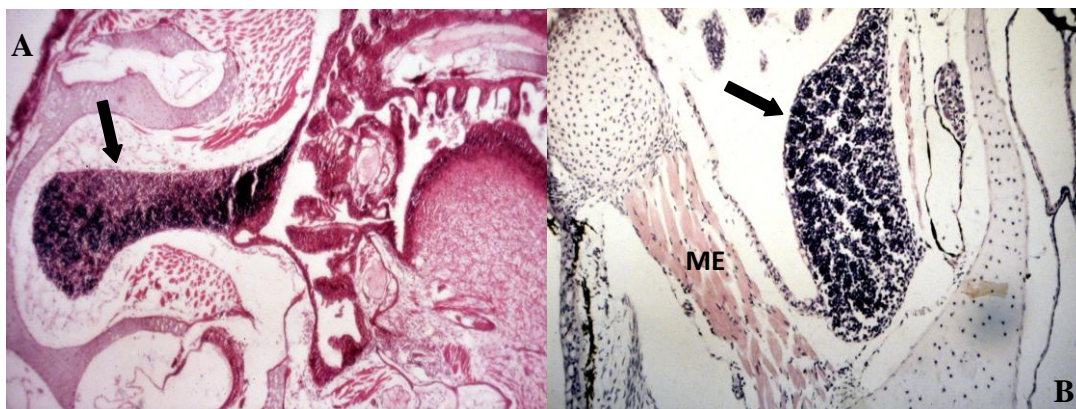


Figura 4: **A:** corte transversal de juvenil de *Carassius auratus* mostrando o timo (seta). HE 20 X. **B:** Juvenil de *Carassius auratus*, onde se observa o timo (seta) como uma massa linfóide. ME: Músculo esquelético HE 20 X. (Material do laboratório de imunologia e patologia de organismos aquáticos (LIPOA) - FURG).

O rim, como o timo, desempenha um papel importante para o funcionamento das funções imunológicas de peixes teleósteos, sendo o órgão responsável pela hematopoiese (Zapata *et al.* 1996). Morfologicamente, a porção anterior deste órgão tem uma grande similaridade com a medula óssea, estrutura que em vertebrados superiores possui tanto a função linfo hematopoiética como também de diferenciação de linfócitos B. Dessa forma, no rim anterior (pronefrons) são produzidos anticorpos (Fänge & Nilsson 1985). Anatomicamente a estrutura e extensão dos pronefrons variam



de acordo com as espécies, mas o quadro histológico é bastante semelhante (Fig 5). Entre os néfrons restantes, fundamentalmente do setor tubular se observa uma porção intersticial com abundante tecido linfo hematopoiético (Cooper 2003).

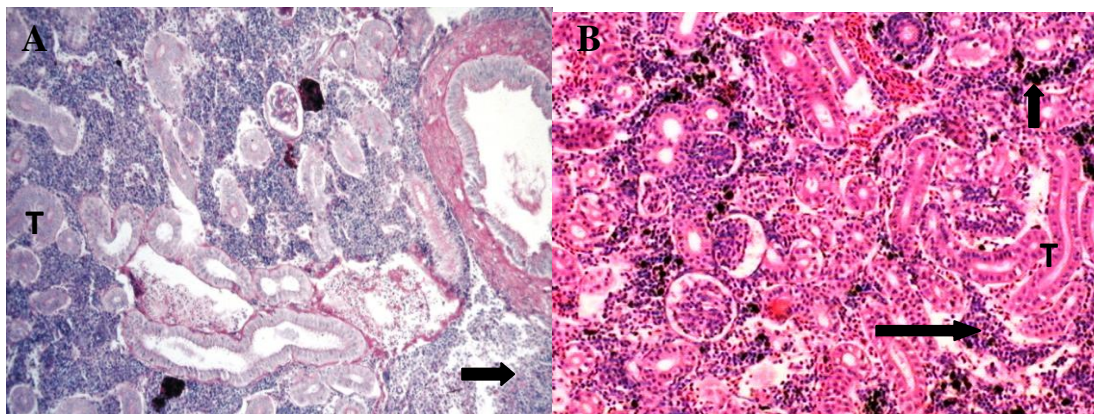


Figura 5: **A:** Rim de juvenil de *Onchorhynchus mykiss* com túbulos (T) e acúmulos de células linfo hematopoiéticas (seta) HE 20 X. **B:** *Onchorhynchus mykiss* com abundante tecido hematopoiético intersticial (seta longa), melanomacrófagos (seta curta) e alguns túbulos renais (T). HE 20 X. (Material do laboratório de imunologia e patologia de organismos aquáticos (LIPOA) - FURG)

O baço consiste de células linfóides que se acumulam em torno dos tecidos formando a primeira barreira de defesa do organismo, sendo dessa forma considerada como órgão linfóide secundário do sistema imunológico (Zapata *et al*, 1996). O baço encontra-se coberto por uma cápsula fibrosa e fina, composto por múltiplos sinusóides cheios de eritrócitos (semelhante a polpa vermelha nos mamíferos). Os linfócitos se encontram rodeando estruturas vasculares que juntamente com os melanomacrófagos formam o corpúsculo elipsóide (semelhante a polpa branca dos mamíferos) que é considerado uma unidade funcional do baço, e possivelmente represente filogeneticamente o primeiro corpúsculo Malphigiano dos animais vertebrados. Os macrófagos que rodeiam os corpos elipsóides participam na eliminação de complexos antígeno-anticorpos (Ellis *et al*. 1976, Ferguson 1989; Danneving & Landsverk 1995).

### 1.5. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é um ramo da técnica histológica, voltada para detecção de antígeno em tecidos; é extremamente útil como um método de diagnóstico. Técnicas

de imunohistoquímica são ferramentas eficazes para o reconhecimento e posterior caracterização de anticorpos monoclonais (Mc Ac). Utilizando essa técnica é possível visualizar uma reação antígeno/anticorpo, específico em uma célula ou tecido, tanto com microscopia óptica como eletrônica (Romano 2008).

A técnica é baseada na aplicação no tecido em estudo, do anticorpo contra o antígeno que se deseja encontrar, em seguida, o anticorpo específico é usado como antígeno e marcado com um segundo anticorpo inespecífico, junto ao sistema enzimático com um complexo peroxidase-antiperoxidase, fosfatase alcalina- anti fosfatase alcalina ou anticorpos biotinilados com o complexo avidina-biotina peroxidase de forma que pode ser detectado por uma técnica de coloração. Neste momento, o exame microscópico de cortes histológicos permite determinar a presença ou ausência do antígeno de interesse, e em casos positivos, pode-se ver o lugar exato do tecido ou célula em que o antígeno se encontra (Romano 2008). (Fig 7)

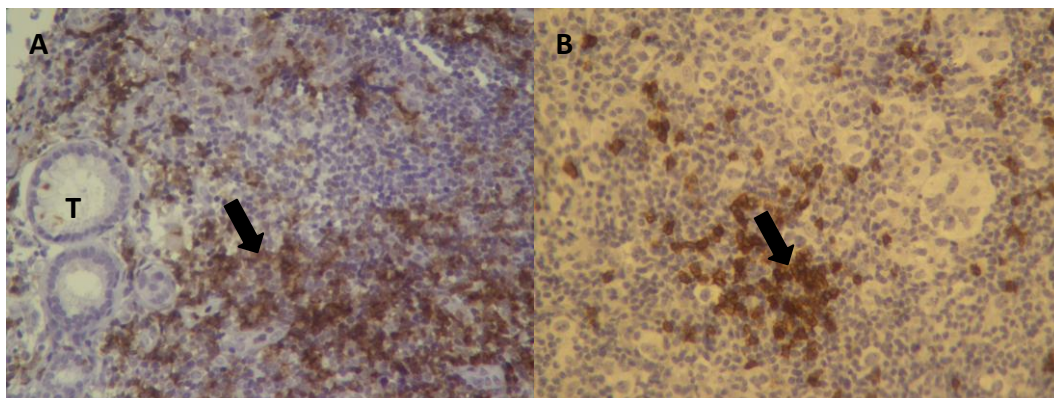


Figura 7: **A:** Rim de juvenil de bijupirá onde se observa alguns linfócitos tímicos CD4 positivos (seta). T: túbulos renais. Anti-CD4 10X. **B:** Timo de juvenil de bijupirá com alguns linfócitos positivos para o receptor CD4 (seta). Anti- CD4 10 X. (Material do laboratório de imunologia e patologia de organismos aquáticos (LIPOA) - FURG)

A técnica de imunohistoquímica apareceu pela primeira vez durante um diagnóstico histopatológico por volta dos anos 70, em seguida sofreu uma enorme expansão a partir da descoberta e aplicação dos anticorpos monoclonais, os quais acrescentaram precisão e especificidade (Ciocca & Bjerche 1986).

Para executar uma técnica de imunohistoquímica é necessário um anticorpo monoclonal ou policlonal específico contra o epítipo que se deseja detectar, um segundo anticorpo relacionado ao anticorpo primário, enzimas, substratos e

cromógenos. As aplicações da imunohistoquímicas são inúmeras. Qualquer antígeno é demonstrado sempre que se encontre com o anticorpo correspondente (Babín *et al.* 1991).

Muitas proteínas animais se mantêm conservadas durante a evolução, pelo qual existe reatividade cruzada entre diferentes espécies, por exemplo, usar o anticorpo anti-CD3 de humanos para marcar o receptor CD3 de outra espécie, é uma alternativa abordada que pode fornecer aos pesquisadores um método mais rentável de produção de anticorpos (Conrad *et al.* 2007). De acordo com Conrad *et al.* 2007, foram identificados novos anticorpos para o estudo de populações de células T em diferentes espécies de animais, elemento essencial na reatividade cruzada e para simplificar pesquisas permitindo uma maior compreensão do sistema imunológico em espécies menos estudadas. Até que a produção de anticorpos se torne mais simples e rentável, estudos com reatividade cruzada continuam a ser explorados.

#### **1.6. Ontogenia do sistema imune**

Informações sobre a ontogenia do sistema imune em peixes são restritas a poucas espécies de teleósteos, como a truta arco-íris, salmão, bagre e zebrafish. Entretanto, a identificação dos primeiros sítios linfo-hematopoiéticos, origem dos linfócitos B e T e a aquisição das capacidades imunológicas permanecem indefinidas (Zapata *et al.*, 2006). O timo surge durante o período inicial de desenvolvimento deste sistema, e as células T (capazes de memória imunológica) se desenvolvem muito antes das células B (Cunha *et al.* 2008).

Para estabelecer a ontogenia do sistema imune, é necessário analisar histologicamente todo período embrionário, a organogênese dos órgãos linfóides no meio do período embrionário e o desenvolvimento do timo e do rim cefálico primordial. Estes órgãos são colonizados por linfócitos primordiais relativamente cedo, porém estas células só se tornam imunocompetentes quando os componentes do estroma dos órgãos não linfóides amadurecem, principalmente as células epiteliais, dendríticas e fibroblásticas. A maturação das células do estroma favorece a maturação das células linfóides, processo que envolve seleção, diferenciação e expansão das células imunocompetentes (Steiner *et al.* 2004).



Para a aquicultura, o conhecimento do momento em que surge a imunidade adquirida em peixes é importante para estimar a idade adequada para, por exemplo, a utilização de vacinas. As vacinas induzem a memória imunológica específica, que por sua vez resultam na produção de anticorpos contra os patógenos (Heppel & Davis 2000). Antes deste período, possivelmente apenas o uso de imunoestimulantes da defesa inata oferecem uma melhor proteção (Rombout *et al.* 2005). Assim é necessário conhecer a partir de qual momento do desenvolvimento os peixes começam a ter capacidade de apresentar resposta imune adquirida, momento este em que a vacina passa a ter eficácia (Heppell & Davis 2000; Mulero *et al.* 2008; Tonheim *et al.* 2008).

O estudo das enfermidades e suas causas e mecanismos de prevenção e defesa é importante para o sucesso de um cultivo (Ozório *et al.* 2004), pois as doenças são uma das principais causas de perdas econômicas na aquicultura em todo mundo (Ozório *et al.* 2004). O tratamento das doenças de peixes apresenta várias dificuldades. Medicamentos como antibióticos, podem trazer riscos tanto para os cultivos quanto para saúde humana, principalmente por sua toxicidade e/ou através da aquisição de resistência dos micro-organismos, e sua utilização na aquicultura é apenas emergencial e métodos menos drásticos como as vacinas, são mais indicados (Alderman & Hastings 1998).

No presente trabalho foi avaliada a ontogenia dos principais órgãos do sistema imune de bijupirá, destacando o surgimento do rim anterior, do timo e do baço. Além de estabelecer a idade em que o sistema imunológico se encontra funcionalmente desenvolvido. Para isso foi avaliada a expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4, permitindo a evidencia do desenvolvimento da imunidade específica nas larvas e juvenis de bijupirá. Também foi possível estabelecer que ocorre uma repovoação de linfócitos T nos pronefrons, fato de grande importância, pois quando os animais se encontram sexualmente maduro o timo se atrofia e desaparece, permanecendo as atividades imune dos linfócitos B e T presentes no rim anterior, como mostra o esquema de repovoação de linfócitos apresentado pela figura 8.

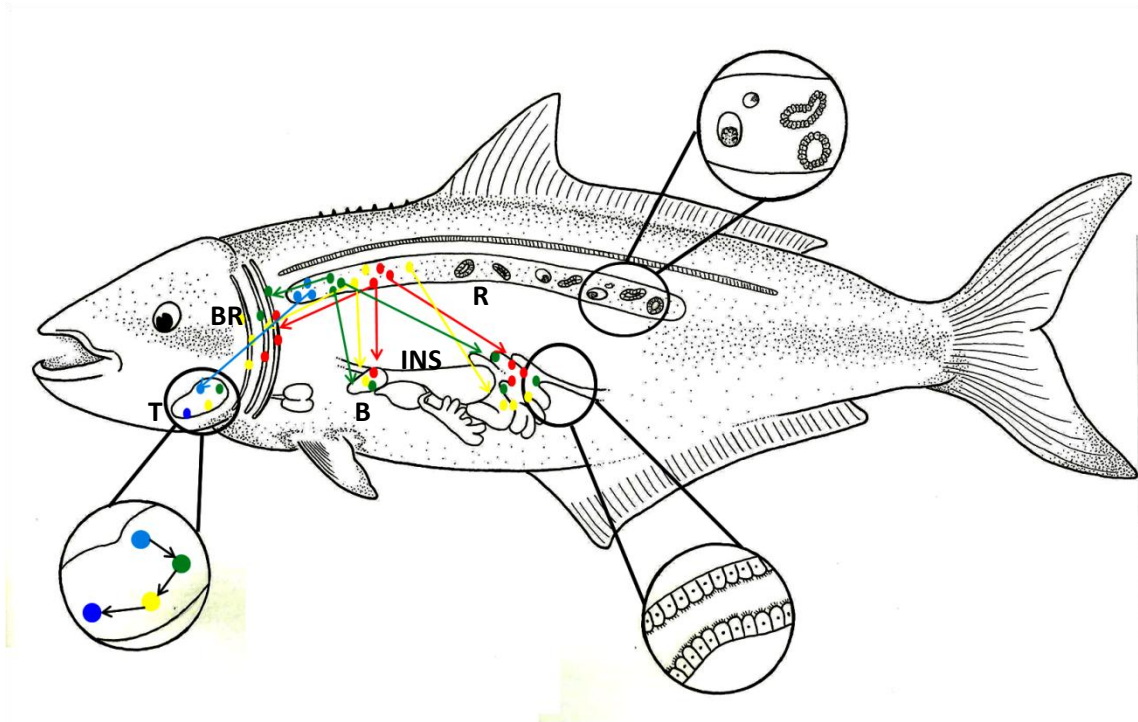


Figura 8: Repovoação de linfócitos no bijupirá *Rachycentron canadum*. No rim anterior (R) são produzidos dois tipos de linfócitos, os linfócitos B (●) e linfócitos indiferenciados (●). Os linfócitos B vão ao sangue periférico e a diferentes órgãos, como brânquia (BR), baço (B) e se incorpora ao tecido linfóide associado a mucosas como no intestino (INS). Os linfócitos indiferenciados vão para o timo (T), no timo todos expressam o receptor CD3, receptor universal para a população linfóide T (●). Alguns linfócitos expressam receptores CD4 transformando-se em linfócitos T4, o auxiliar (●), que interage com várias células e inicia e ativa o mecanismo de resposta específica incluindo a memória imunológica. Por último se induz a proliferação de linfócitos com receptores CD8 que se expressa nos linfócitos T8, o citotóxicos (●). Posteriormente os linfócitos tímicos já diferenciados em subpopulações vão ao sangue periférico formando junto aos linfócitos B uma população linfóide mista, e logo quando o timo involui com a maturação sexual fica garantida a continuação da produção de linfócitos tímicos no rim. (Ilustração-Fabiane Fürh)

## 2- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., JS POBER & AH LICHTMAN. 2007. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier- Saunderd Edit; 243-268/545.
- AGIUS C. 1979. The role of melano-macrophage center in iron storage in normal and diseased fish. *J. Fish. Disease*. 2: 337-343.
- AGIUS, C. & R ROBERTS, 2003. Review Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. of fish Diseases*. 26: 499-509
- AGIUS, C. & SA AGBEDE, 1983. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *J. Fish Biol*. 24: 471-488.
- ALDERMAN, DJ & TS HASTINGS. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *J. Food Science and Technol.*, 33: 139-155.
- ANDERSON, DP. 1990. Immunological Indicator: Effects of Environmental Stress on Immune Protection and Disease Outbreaks. American Fisheries Society Symposium. 8: 38-46.
- ARNOLD, C. R., JB KAISER & GJ HOLT. 2002. Spawning of cobia (*Rachycentron canadum*) in captivity. *J. World Aquaculture Society*; 33: 205–208
- BABÍN MC; C HERNANDEZ, JD SÁNCHEZ. 1991. Obtención de anticuerpos monoclonales frente al virus IPN: su utilización para el diagnóstico por medio de la inmunofluorescencia. (IF). *Med. Vet*. 8: 85-89.
- BALDO BA & TC FLETCHER. 1973. C-reactive protein-like precipitins in plaice. *Nature, Lond*. 246: 145-147.
- BAILLY Y, S DUNEL-ERB, M GEFFARD & P LAURENT. 1989. The vascular and epithelial serotonergic innervation of the actinopterygian gill filament with special reference to the trout, *Salmo gairdneri*. *Cell Tissue Res*. 258: 349-363.
- BATISTA, CR. 2011. “Efeito da superexpressão do hormônio do crescimento (GH) sobre o desenvolvimento do sistema imunológico de zebrafish (*Danio rerio*)”

- Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Rio Grande. Novembro de 2011.
- BECKMAN M. 2005. Jawless Fish Have Form of Adaptive Immunity. *Science*, 310: 1892-1893.
- BENETTI DD, R ORHUNM, B SARDENBERG, B O'HANLON, A WELCH, R HOENIG, I ZINK, JÁ RIVERA, B DENLINGER, D BACCOAT, K PALMER, F CAVALIN. 2008. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Aquacult. Res.*, 39:701-711.
- BEVAN, MJ. 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nature Reviews Immunology*, v.4, n.8, p. 595-602.
- BROWN-PETERSON, NJ, RM OVERTREET, JM LOTZ, JS FRANKS, KM BURNS. 2001. Reproductive biology of cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States. *Fish Bull*, v.99:15-28.
- CAIN KD, DR JONES & RL RAISON. 2002 Antibody-antigen kinetics following immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with a T-cell dependent antigen. *Developmental and Comparative Immunology*; 26, 181–190.
- CHILMONCZYK, S. 1992. The Thymus in fish: development and possible function in the immune response. *Annual. Rev. Fish Diseases*, 181-200(185).
- CHOU, R, MS SU, HY CHEN. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 193:81-89.
- CLEVERS H, B ALARCON, T WILEMAN, C TERHORST. 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble, *Annual Reviews Immunology*; v.6: 629–662.
- CIOCCA, DR & RJ BJERCKE. 1986. Immunohistochemical Techniques Using Monoclonal Antibodies. *Methods in Enzymology*. 121: 562-579.
- CONRAD, M, W DAVIS & B KOOP. 2007. TCR and CD3 Antibody Cross-Reactivity in 44 Species. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 71:925-33.
- COOPER, EL. 2003. Comparative Immunology. *Integr. Comp. Biol.*, 43:278–280.
- CRAIG, SR, MH SCHWARZ, E MCLEAN, 2006. Juvenile cobia (*Rachycentron canadum*) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. *Aquaculture*; 261, 384–391.

- CUNHA, MC, P MAKRIDIS, F SOARES, P RODRIGUES & MT DINIS. 2008. Timing of Appearance of Lymphoid Cells During Early Development of Senegalese Sole, *Solea senegalensis* Kaup. *J. World Aquacul. Soc.*, 39:436-439.
- CUSHING J. 1975. Immunology and the processes for evolution. *Dev Comp Immunol*, 1: 65-69.
- DANNEVING, DH, T LANDSVERK. 1995. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 282(1):41-48.
- DUNEL-ERB S, Y BAILLY & P LAURENT. 1989. Neurons controlling the gill vasculature in five species of teleosts. *Cell Tissue Res*; 255:67-573.
- ELLIS, AE, AL MUNROE, RJ ROBERTS. 1976. Defense mechanism in fish, a study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *J Fish Biol.* 8:67-78.
- ELLSAESSER, CF, JE BLY, LW CLEM. 1988. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. The thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 12: 787-799.
- FANGE, R & S NILSSON. 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia*, v. 41:152–158.
- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. 2010. Rome: FAO.
- FAO. 2011, FISHSTAT PLUS: Universal software for fishery statistical time series. Version 2.3.2000. Rome: Fisheries Department Fishery Information, Data and Statistics Unit, FAO.
- FAULK CK. & GJ HOLT. 2006. Responses of cobia *Rachycentron canadum* larvae to abrupt or gradual changes in salinity. *Aquaculture* 254, 275-283.
- FAULK, CK, JB KAISER, GJ HOLT. 2007. Growth and survival of larval and juvenile cobia *Rachycentron canadum* in a recirculating raceway system. *Aquaculture*, 270:149-157.
- FAULK, C & G HOLT. 2008. Biochemical composition and quality of captive-spawned cobia *Rachycentron canadum* eggs. *Aquaculture*, 279: 70-76.
- FERGUSON, HW. 1989. Systemic Pathology of Fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts (Iowa State University Press, Ames), p5-103- *Espenes, A., Press, C.M.L.*

- FIGUEIREDO, JL, NA MENEZES. 1980. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. III. Teleosteo (2). São Paulo: Museu de Zoologia da USP, 90p.
- FLETCHER TC, A WHITE, A YOUNGSON, A PUSZTAI & BA BALDO. 1981. Characterization of C- reactive protein from the eggs of the marine teleost. *Cyclopterus lumpus.L.Biochim Biophys Acta*, 671: 44-9.
- FRANKS, JS, NJ BROWN-PETERSON, 2002. A review of age, growth, and reproduction of cobia, *Rachycentron canadum*, from U.S. waters of the Gulf of Mexico and Atlantic Ocean. Proceedings of the Gulf and Caribbean Fisheries Institute, v.53, p.552- 569.
- GENTEN, F, E TERWINGHE & A DANGUY. 2009. Atlas of fish histology. Imune system and hematopoiesis. p57-215.
- GOPAKUMAR, G, G NAZAR, M TAMILMANI. 2011. Breeding and seed production of cobia *Rachycentron canadum* in India. In: ASIAN-PACIFIC AQUACULTURE 2011, Kochi, India: World Aquaculture Societ.
- HEPPELL, J & HL DAVIS. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews*; 43:29-43.
- HERNANDEZ, MP & AG. ZAPATA. 1986. Structure and function o the melano-macrophage centers of the goldfish *Carasius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12:117-126.
- HIBIYA, T, 1982. An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features. Gusta Fischer Verlag. New York, Tokio. p102-107 / 307
- HOLLAND, MC & JD LAMBRIS. 2002. The complement system in teleosts. *Fish & Shellfish Immunol.* 12: 399–420.
- HOLT, GJ, CK FAULK, MH SCHWARZ. 2007. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture*, 268:181-187.
- KAISER, JB & GJ HOLT. 2005. Species profile cobia. (S.I.): Southern Regional Aquaculture Center. (Report, 7202).
- KLAUSNER, RD; J LIPPINCOTT-SCHWARTZ & JS BONIFACINO. 1990. The T cell antigen receptor: insights into organelle biology. *Annual Review of Cell Biology*, v.6: 403-31.

- KLOSTERHOFF, MC & LA ROMANO. 2012. Pulse granulomas detected in peritoneum of a wild rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* with acanthocephalan infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, V32(2): 63/67.
- KODAMA H, Y MATSUOKA, Y TANAKA, Y LIU, T IWASAKI & S WATARAI. 2004. Changes of C- reactive protein levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sera after exposure to anti-ectoparasitic chemicals used in aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*, 16: 589-97.
- LEVRAUD, JP, & P BOUDINOT. 2009. The immune system of teleost fish. *Med.Sci.* v.25(4):405-11
- LIAO, IC, TS HUANG, WS TSAI, CM HSUEH, SL CHANG, EM LEAÑO. 2004. Cobia culture in Taiwan: current status and problems. *Aquaculture*, 237:155-165.
- LIAO IC & EM LEAÑO. 2007. Cobia aquaculture: research, development and commercial production. Taiwan: *Asian Fisheries Society*, 178: 115-129.
- LUCENA R. 1990. Células Neuroectodérmicas en peces teleósteos. Su distribución, estructura y función. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires; 275p.
- MACCHI, JG, LA ROMANO, HE CHRISTIANSEN. 1992. Melano-Macrophage Centres as Biological Indicators of Environmental Change in Whitemouth Croaker, *Micropogonias furnieri*. *J. Fish. Biol.* 40: 971-973.
- MAGNADÓTTIR, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunol.* 20: 137-151.
- MALE, DK, J BROSTOFF, IV ROITT, DB ROTH. 2006. Immunology. *Elsevier Health Sciences*, p.58-69, 552.
- MAISEY, K. & M IMARAI. 2010. Diversity of teleost leukocyte molecules: Role of alternative splicing. *Fish & Shellfish Immunol.*, v.31: 663-672.
- MATSUYAMA, T & T IIDA. 2002. Tilapia mast cell lysates enhance neutrophil adhesion to cultured vascular endothelial cells. *Fish Shellfish Immunol*, 13, 243-250.
- MARSDEN, MJ, LM VAUGHAN, TJ FOSTER & CJ SECOMBES. 1996. A Live *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis T. J. preferentially stimulates T-

- Cell responses relative to B-Cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect Immunity*, Sept:3863–3869
- MULERO, I; MP SEPULCRE, I FUENTES, I GARCIA-ALCAZAR, J MESEGUER, A GARCIA-AYALA, V MULERO, 2008. Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence. *Molecular Immunology* 45:2981-2989.
- NAIM A, NA KHAN & P DESCHAUX. 1997. Role of serotonin in fish immunomodulation. *The Journal of Experimental Biology*. 200: 1833–1838.
- NIELSEN, ME & MD ESTEVE-GASSENT. 2006. The eel immune system: present knowledge and the need for research. *J. Fish Dis.* 29: 65-78.
- NHU, VC, QH NGUYEN, TL LE. 2011. Cobia *Rachycentron canadum* aquaculture in Vietnam: recent developments and prospects. *Aquaculture*, v.315, p.20-25.
- OZÓRIO, R, Y AVNIMELECH & N CASTAGNOLLI. 2004. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: Tópicos especiais em piscicultura de água doce Tropical Intensiva. SP, Brasil. 2:7-23.
- PARK, IY, CB PARK, MS KIM & SC KIM. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett.* 437:258–262.
- PATRZYKAT A, L ZHANG, V MENDONZA, GK IWAMA & REW HANCOCK. 2001. Synergy of Histone-Derived Peptides of Coho Salmon with Lysozyme and Flounder Pleurocidin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1337–1342.
- PRESS, CM. & O EVENSEN. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish & Shellfish Immunol*, v. 9, n. 4, p. 309-318.
- POVOA P. 2002. C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. *Intensive Care Med*; 28: 235- 43.
- RESLEY, M, K WEBB, J HOLT, 2006. Growth and survival of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at different salinities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, v.253, p.398- 407.
- ROMANO, L.A. 2008. La inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica de enfermedades de los peces. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*. 417: 379-386.



- ROMANO, LA, 2010. El sistema Imune Inespecífico de los Peces. Em: Patologia Sanidade de organismos Aquáticos. ABRAPOA. Silva –Souza A.T., Perez Lizama M. A., Takemoto R. M., (Editores) pg.550.
- ROMBOUT, JH, HB HUTTENHUIS, S PICCHIETTI, G SCAPIGLIATI. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunol.* 19:441-455.
- ROSE, F, RK BAILEY, JW KEYTE, W CHAN, CD GREENWOOD & YR MAHIDA. 1998. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 proteins in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 66:3255–3263.
- RUBIO-GODOY, M. 2010. Inmunología de los peces óseos: Revisión. Revista Mexicana Ciências Pecuária, v. 1, p. 47-57.
- SAMPAIO, LA, R SANTOS, MH SCHWARZ, 2008. Growth and survival of juvenile cobia *Rachycentron canadum* exposed to chronic acid stress. Proceedings...usan: World Aquaculture 2008.
- SAMPAIO, LA, MB TESSER, W WASIELESKY. 2010. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. *Revista brasileira de Zootecnia.* v.39:102-111.
- SANCHES, EG, 2007. Piscicultura marinha no Brasil: uma alternativa de produção e conservação. *Aquicultura e Pesca*, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 16-22.
- SEGOVIA-VALLE, E, G SEGOVIA-CRUZ, M SEGOVIA-CRUZ, 2006. Study of growth in oceanic platform of *Rachycentron canadum* in Yucatan peninsula. In: World Aquaculture Society Annual meeting, Florence, Italy. Proceedings... Florence: World Aquaculture Society, (CD-ROM).
- SINGH P, A. KRISHNA & R. SRIDARAN. 2007, Localization of gonadotrophin-releasing hormone I, bradykinin and their receptors in the ovaries of non-mammalian vertebrates. *Reproduc.* 133 969–981.
- STEINER, LA, N DANILOVA & CE WILLET. 2004. The immune system in zebrafish, in *Molecular Biology of B Cells*, 3rd edition, F. W. Alt, T.Honjo, M.S. Neuberger, ed. Elsevier Academic Press, London. pp231-245(556).

- SHAFFER, RV & EL NAKAMURA, 1989. Synopsis of biological data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82. U.S. Department of Commerce, Washington, DC. 432.
- STOSKOPF, MK. 1993. Clinical pathology. in M.K. Stoskopf, editor. Fish medicine. W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania, USA.
- SUN, L, H CHEN, L HUANG, 2006. Effect of temperature on growth and energy budget of juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, v.261, p.872-878.
- TONHEIM, TC, J BOGWALD, RA DALMO. 2008. What happens to DNA vaccine in fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunol.* 25:1-18.
- TRICHET, VV. (2010). Nutrition and immunity: an update. *Aquaculture Research.* 41: 321-449
- WATANABE, N, Y WANG, HK LEE, T ITO, Y WANG, W CAO & Y LIU. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436:1181-85.
- WEIRICH, CR, TIJ SMITH, MR DENSON, 2004. Pond culture of larval and juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, in the Southeastern United States: initial observations. *Journal of Applied Aquaculture*, v.16, p.27-44.
- WEBB, KA, GM HITZFELDER, CK FAULK & GJ HOLT. 2007. Growth of juvenile cobia, *Rachycentron canadum*, at three different densities in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 264, 223-227.
- YOUSIF, OM, KK KUMAR, AFA ABDUL-RAHMAN, 2009. Growth response of cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae) under the hypersaline conditions of the Emirate of Abu Dhabi. *Aquaculture Asia Magazine*, v.13:41-42.
- YOSHIO T. T TSUCHIDA, Z LI & JM CONLON. 2001. Antidipsogenic effects of eel bradykinins in the eel *Anguilla japonica*. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 281:1090-1096.
- ZAPATA, A, A CHIBA, & A VARAS. 1996. Cells and Tissues of the Immune System of Fish. In: IWAMA, G. e NAKANISHI, T. The Fish Immune System. London: Academic Press, p. 1-62.

- ZAPATA, A.; B DIEZ, T CEJALVO, C GUTIERREZ-DE FRÍAS & A CORTÉS.  
2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20:126-136.
- ZHU, J. & WE PAUL. 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, v. 112, n. 5, p. 1557-69.

### **3- OBJETIVO GERAL:**

- Descrever e estabelecer a ontogenia do desenvolvimento dos órgãos imunocompetentes (rim, timo e baço) em larvas e juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum* através de técnicas de histologia e imunohistoquímica.

#### **3. 1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Descrever o aparecimento do rim anterior, timo e baço durante a ontogênese em larvas e juvenis de bijupira;

- Estabelecer a presença de receptores específicos de linfócitos T através da imuno marcação com anticorpo anti-CD3, para verificar a presença da população linfóide geral.

- Estabelecer a presença de receptores específicos de linfócitos T4 (auxiliar) através da imuno marcação com anticorpo anti-CD4, para verificar a presença entre a população de linfócitos tímicos mencionados anteriormente que são responsáveis pelo desenvolvimento da imunidade específica e memória imunológica.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUÍCULTURA**

**Desenvolvimento ontogênico do rim, timo e baço e expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4 em linfócitos do bijupirá *Rachycentron canadum***

Proponente: Marta da Costa Klosterhoff  
Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano  
Co-orientador: Prof. Dr. Joaber Pereira Júnior

Rio Grande-RS

Formatado nas normas da Revista Atlântica

## Resumo

O bijupirá *Rachycentron canadum*, é atualmente explorado em várias pesquisas, apesar de não haver ainda produção comercial no Brasil, seu cultivo é muito promissor, devido a características favoráveis. Devido aos poucos conhecimentos na área do sistema imunológico, o objetivo deste trabalho foi descrever a ontogenia dos órgãos do sistema imune desta espécie. Foram utilizadas larvas e juvenis, desde a eclosão até 53 dias após a eclosão. Através da análise histológica foi constatado o surgimento do rim anterior com 1 dia após a eclosão (dae), logo o baço com 5 dae e por último o timo com 7 dae. Também foi estabelecida a idade em que o sistema imunológico se encontra funcionalmente desenvolvido, através da avaliação da expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4 dos linfócitos. Foi encontrado no timo os primeiros receptores linfocitários CD3 ao 7º dae e no rim foi destacada no 8º dae. Após 7 dae foi verificado a presença de linfócitos T4 no timo e no 13º dae no rim, indicando a aquisição da imunidade específica e a presença da memória imunológica nas larvas e juvenis de bijupirá. Esse trabalho é de importância para estabelecer mecanismos de prevenção em peixes contra patógenos em idade precoce, como o uso da vacina, permitindo melhorias no desenvolvimento de cultivos na aquicultura.

Palavras chave: bijupirá, sistema imunológico, ontogenia, CD3 e CD4.

## **Abstract**

In the recent years, the cobia *Rachycentron canadum* has been greatly studied, and although there is no commercial production of this species in Brazil, its farming is very promising, due to its positive characteristics. However, there is little knowledge about the immune system of this species. Thus, the aim of this work was to describe the ontogeny of the lymphoid organs of cobia. The kidney was found one day after hatching (dah), followed by the spleen at 5 dah, and finally the thymus appeared after 7 dah. Larvae and juveniles were used, from hatching to 53 dah, with some intervals. The age at which the immune system is functionally designed was established, by assessing the phenotypic expression of the CD3 and CD4 receptors of lymphocytes. At 7 dah, the presence of T4 lymphocytes was registered in the thymus and at 13 dah in the kidney setting the development of specific immunity in larvae and juveniles of cobia. This study is important in order to establish preventive mechanisms against fish pathogens at an early age, such as the use of the vaccines, and to improve fish aquaculture.

**Keywords:** cobia, immune system, ontogeny, CD3 and CD4.

## 1. Introdução

O bijupirá, *Rachycentron canadum* (Rachycentridae) é um peixe carnívoro com ampla distribuição nas águas tropicais e subtropicais dos oceanos Pacífico, Atlântico, Índico e com exceção da porção leste do Pacífico (Shaffer & Nakamura, 1989; Brown-Peterson et al. 2001). Essa espécie apresenta várias características favoráveis para o desenvolvimento da aquicultura, principalmente sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade ao confinamento, aceitação de dietas secas e capacidade de reprodução em cativeiro (Chou et al. 2001; Craig et al., 2006; Faulk & Holt 2006; Liao & Leão 2007) entre outras. Por outro lado, como o bijupirá é uma espécie recente na aquicultura, ainda são poucos os conhecimentos sobre alguns aspectos, como a fisiologia de alguns sistemas, como por exemplo, o sistema imune e a caracterização das células, tecidos e órgãos que participam na resposta imune e aspectos relacionados com a ontogenia deste sistema (Holt et al. 2007).

O sistema imune é classificado em sistema imune inato inespecífico e o sistema específico ou adaptativo. O sistema imune inespecífico é antígeno independente, ou seja, qualquer que seja o antígeno a resposta será semelhante e ao longo do tempo a presença do mesmo antígeno não altera a resposta, ou seja, não há memória imunológica. Este sistema atua como primeira linha de defesa contra a presença de um agente patogênico e no controle de muitas infecções sem recorrer ao sistema específico (Romano 2010). Um dos principais mecanismos desse tipo de imunidade é a fagocitose. Em alguns casos, quando o material fagocitado é muito grande, ocorre formação de células gigantes multinucleadas como em mamíferos (Klosterhoff & Romano 2012).

A resposta imune específica ou adaptativa é antígeno dependente, ou seja, gera uma resposta específica contra um antígeno determinado e não contra outro, além de produzir memória imunológica. A capacidade de ter memória imunológica permite a produção de uma ferramenta de grande importância para o controle de doenças infecciosas que são as vacinas (Marsden et al. 1996).

A imunidade específica é subdividida em dois padrões de resposta, a imunidade específica humoral e a imunidade específica celular (Rubio-Godoy 2010). A imunidade humoral funciona através da produção de imunoglobulinas (Ig) pelos linfócitos B,



especificamente a IgM, presentes no sangue e nas secreções das mucosas de peixes. A IgM reconhece antígenos, neutraliza e forma um complexo antígeno anticorpo, no qual os antígenos serão eliminados por fagocitose (Rubio-Godoy 2010).

A imunidade celular é mediada pelos linfócitos T e existem subpopulações de linfócitos T com funções específicas. Ao chegar ao timo, os linfócitos provenientes do rim anterior adquirem o receptor CD3 (indicador de linfócito tímico universal – LT). Alguns destes também adquirem receptores CD4 que indicam que são linfócitos T4 auxiliares e outros adquirem o receptor CD8 e tornam-se linfócitos T8, os citotóxicos. Existe uma relação entre esses linfócitos, basicamente comandada pelo LT4 auxiliar que interage com as demais populações linfóides, inclusive o linfócito B (Male et al. 2006).

Para estabelecer a ontogenia do sistema imune dos peixes, é necessário analisar histologicamente os órgãos linfóides, fundamentalmente o timo, o rim anterior e o baço (Steiner *et al.* 2004). O timo em peixes teleósteos apresenta similaridade estrutural e funcional com o de mamíferos, contendo tipos celulares fundamentais para a imunidade adaptativa, sendo o órgão fundamental para diferenciação e maturação da linhagem linfóide T (Zapata *et al.* 1996). O rim, assim como o timo, desempenha um papel importante para o funcionamento do sistema imunológico de peixes teleósteos, sendo o órgão responsável pela linfopoiese (Zapata *et al.* 1996). O baço consiste de sinusóides esplênicos, rodeados por células linfóides, que contém eritrócitos. Sua unidade funcional é o corpo elipsóide, um capilar rodeado por macrófagos, e aparentemente estes macrófagos participam na eliminação do complexo antígeno-anticorpo (Ferguson 1989, Danneving & Landsverk 1995).

Informações sobre a ontogenia dos órgãos do sistema imune em peixes são restritas a poucas espécies de teleósteos, como por exemplo, a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), salmão (*Salmo salar*) e zebrafish (*Danio rerio*). Entretanto, a identificação dos primeiros sítios linfopoieticos, origem dos linfócitos B e T e a aquisição das capacidades imunológicas completa permanecem ainda indefinidas (Zapata et al. 2006).

O estudo de mecanismos de prevenção de doenças é importante para o sucesso de uma criação de peixes, pois as doenças são uma das principais causas de perdas econômicas na aquicultura em todo mundo (Ozório *et al.* 2004). O tratamento das doenças de peixes apresenta várias barreiras, pois medicamentos como antibióticos,

podem trazer riscos tanto para os cultivos quanto para saúde humana. Sua utilização na aquicultura é apenas emergencial, métodos menos drásticos, como as vacinas, são mais indicados (Alderman & Hastings 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ontogenia dos órgãos do sistema imune do bijupirá através de técnicas de histologia convencionais e a expressão fenotípica dos receptores linfóides CD3 e CD4 através de imunohistoquímica. Estabelecendo a idade em que o sistema imunológico se encontra desenvolvido e funcional, com a presença da população linfóide mista e memória imunológica, assim podendo estabelecer o momento em que os animais estariam aptos a receber vacinas.

## 2. Material e Métodos

### 2. 1. Obtenção das larvas e juvenis e manutenção em laboratório

As larvas de bijupirá foram produzidas no Laboratório da Empresa Aqualider Maricultura Ltda., Ipojuca, PE. A produção das larvas seguiu o protocolo de larvicultura de Benetti et al. (2008) com modificações.

As larvas recém eclodidas foram estocadas em um tanque de fibra de vidro de 12000L na densidade de 15 larvas/L. Os tanques foram mantidos em fluxo contínuo com uma taxa de renovação mínima 500% ao dia. A temperatura da água foi mantida em  $29,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$  e a salinidade de 35. O oxigênio dissolvido e o pH foram mantidos nos valores de  $>6,5 \text{ mg/L}$  e  $8,09 \pm 0,1$ , respectivamente, mantidos desde a desova.

O enriquecimento dos rotíferos e artêmias foram realizados com 85% Algamac 3050, 10% Algamac ARA, 5% Algamac Astaxantina. Durante o período de enriquecimento o rotífero foi mantido na concentração de 500-600 rot/mL e foi utilizado 0,6 g /L da solução de enriquecimento para cada 1.000.000 de rotíferos durante 6h. E a artêmia foi mantida na concentração de 250-300 art/mL, e foi utilizado 0,6 g/L da solução de enriquecimento para cada 1.000.000 de artêmia durante 24hs.

A primeira alimentação foi fornecida no 2º dia após a eclosão (dae), e até o 6º dae foram alimentados apenas com rotíferos (*Brachionus plicatilis*) enriquecidos. No 7º e 8º dae foram alimentados com rotíferos enriquecido e náuplios de artêmia recém eclodidos. Durante todo o período de alimentação com rotífero foi também utilizada a microalga *Nannochloropsis oculatta* na densidade de  $15 \times 10^4$  células/mL. A partir do 9º

e 10° dae, as larvas foram alimentados apenas com náuplios de artêmia; do 11° até o 15° dae a alimentação foi exclusivamente com artêmia enriquecida. Dos 16° até o 27° dae foi realizado um período de co-alimentação com artemia enriquecida e ração (Ração NRD - Inve, EUA- 59% de proteína, 16% lipídio). As larvas foram alimentadas a cada 4h; a partir do 28° dae foram alimentados somente com ração. Durante todo o período foram alimentados 6 vezes ao dia.

## 2.2. Análise histológica

Foram coletados 15 a 20 espécimes diariamente, desde a eclosão até 15 dias após eclosão (dae). Depois deste período, um número igual foi coletado aos 17, 19, 21, 23, 25, 28, 49 e 53 dias após a eclosão, prazo em que não mais são observadas modificações substanciais no sistema imune da maioria das espécies de peixes (Hafter 1952; Lu 1998; Nielsen & Esteve-Gassent 2006).

As larvas e os juvenis de bijupirá foram anestesiados com benzocaína após coleta e fixados com formol tamponado a 20%. Os peixes foram individualmente medidos, já fixados, para verificação do comprimento total com o auxílio de uma lupa. As amostras foram processadas no processador automático de tecidos LUPE PT 05 com inclusão em Paraplast (Sigma). Após o emblocamento, os blocos foram cortados a 4µm no micrótomo LUPETEC MRPO3 e corados com hematoxilina-eosina e PAS azul de Kuhnn. A partir das lâminas obtidas das larvas e juvenis de bijupirá, os cortes foram fotografados com uma câmera digital (Olympus DP72) conectada a um microscópio óptico (Olympus BX45). Foi verificado o desenvolvimento dos órgãos linfóides (rim anterior, timo e baço), estabelecendo o surgimento e crescimento desses órgãos.

## 2.3. Imunohistoquímica

Na imunohistoquímica dos órgãos linfóides foram utilizados os mesmos animais processados para as análises histológicas. Após a desparafinização e hidratação, os cortes foram lavados com água (5min), em seguida expostos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 1% em metanol durante 30 minutos para bloqueio da atividade da peroxidase endógena e lavada em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,2, por 20 minutos. Em seguida foram incubadas com albumina sérica bovina (3%) em PBS (BSA, type V Sigma Chemical®, Saint Louis, Mo, USA) durante 40 minutos. Os cortes foram

incubados em câmara úmida (90 min) com um anticorpo monoclonal anti- CD3 e anti-CD4 (Dako, Argentina) de uso humano, colocados em uma diluição em PBS 1:1000, em seguida lavados em PBS e inoculados (45 min) com o complexo avidina-biotina-peroxidase, segundo metodologia de Hsus (1981). Posteriormente os cortes foram lavados com solução 0,1% diaminobenzidina (Sigma), desidratados e contrastados com hematoxilina e eosina (HE), as lâminas foram montadas e examinadas em microscópio óptico.

#### 2.4. Análises morfométricas

O comprimento e a área total do rim, timo e baço foram avaliados segundo o método adaptado, previamente por Weibel & Gomez (1962), Gundersen & Jensen (1985). Para determinar o comprimento e a área total dos órgãos, utilizou-se uma ocular de integração de 5 linhas e 25 pontos (Carl Zeiss). A avaliação da expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4 foi realizada pelo método previamente descrito por Weibel (1980), Romano (1996) e expressado em porcentagem de expressão fenotípica por milímetros quadrados de tecido (%/mm<sup>2</sup>).

A análise dos dados, assim como a realização dos gráficos foi realizada com a utilização do software Statistica 7.0. Os resultados do presente estudo estão expressos em média  $\pm$  erro padrão.

### 3. Resultados

#### 3.1. Análises histológicas

Conforme a análise histológica dos órgãos linfóides do bijupirá, o surgimento dos órgãos segue uma sequência como o rim anterior, baço e timo. O rim anterior está anatomicamente localizado no retroperitônio entre o peritônio parietal e coluna vertebral. É o primeiro órgão linfohematopoiético a aparecer, presente no 1º dae com apenas dois túbulos renais e ausência de células linfo hematopoiéticas, estas surgem no 2º dae. A massa de tecido hematopoiético aumentou progressivamente com a idade dos peixes. No 4º dae, aumenta a população das células linfohematopoiéticas e o número de túbulos renais, surgindo o primeiro glomérulo. Do 5º ao 8º dae ocorre um aumento do número de túbulos renais com predomínio de células linfohematopoiéticas. A partir do 9º

dae verifica-se um aumento da extensão do rim anterior e suas estruturas renais se tornam mais evidentes. Por volta de 49 e 53 dae, glomérulos e túbulos renais estão distribuídos uniformemente envoltos por grande quantidade de células linfohematopoiéticas (Fig.1, D-E-F).

O timo é um órgão bilateral composto por uma massa uniforme de células linfóides e rodeado por uma fina cápsula fibro conectivo, envolto pelo epitélio faríngeo situado na região dorsal de cada cavidade branquial. Seu volume aumenta mais lentamente do que o rim e o baço. No 7º dae ocorre a primeira evidência do timo, representado por uma pequena população de linfócitos. No decorrer dos dias ocorre um aumento da massa linfocitária. No 15º dae em diante as células linfóides e o epitélio faríngeo se tornam bastante evidentes. A partir do 23º dae o timo apresenta-se dividido em três lóbulos e por volta dos 49 e 53º dae o timo encontra-se envolto por uma grande porção do epitélio faríngeo. No 53º dae é encontrado em sua massa uniforme de linfócitos estruturas semelhantes a corpúsculos de Hassal, também encontrado no timo de mamíferos e humanos (Fig.1 A-B-C).

O baço possui tecido linfóide difuso com presença de centros melanomacrófagos. Encontrado na cavidade peritoneal adjacente à parede do intestino e perto do tecido pancreático. Tornou-se evidente com o aumento da idade. O surgimento do baço foi no 5º dae, encontrado apenas um primórdio desse órgão, com um pequeno número de células esplênicas. Com 10 dae verifica-se um aumento no número de células e o surgimento de alguns centros melanomacrofágicos. Aos 53 dae apresentou grande quantidade de células esplênicas, com suas estruturas bem mais evidentes (Fig. 2 A-B).

### 3.2 Análises Morfométricas:

O comprimento das larvas e juvenis de bijupirá apresentou um tamanho médio inicial de  $3,8 \pm 0,04$  mm com 1 dia após a eclosão (dae), apresentando um crescimento exponencial ao longo dos dias, atingindo um tamanho final de  $154 \pm 4,6$  mm com 53 dae (Fig.3), essas medidas foram obtidas com peixes fixados.

Os resultados da morfometria do rim, do timo e do baço revelaram um aumento gradativo no tamanho dessas estruturas em relação ao comprimento larval.

Com 1 dae ( $3,8 \pm 0,04\text{mm}$ ) o rim apresentou comprimento inicial de  $0,11\text{mm}$  e área total de  $0,11\text{mm}^2$ , tornando-se mais evidente com  $2,6\text{ mm}$  de comprimento e  $1,18\text{ mm}^2$  de área total com 12 dae ( $8,3 \pm 0,4\text{ mm}$ ) e atingindo o máximo em 53 dae ( $154 \pm 4,6\text{ mm}$ ) com uma média de comprimento e área total de  $3,3\text{ mm}$  e  $12,3\text{ mm}^2$  (fig.4 A-B).

O timo com 7 dae ( $5,4 \pm 0,20\text{ mm}$ ) apresentou comprimento e área total inicial de  $0,14\text{ mm}$  e  $0,17\text{ mm}^2$ , se destacando mais aos 21 dae ( $29,8 \pm 2,1\text{ mm}$ ) com  $0,32\text{ mm}$  e  $0,28\text{ mm}^2$  chegando a medir  $0,49\text{ mm}$  e  $1,68\text{ mm}^2$  aos 53 dias após a eclosão ( $154 \pm 4,6\text{ mm}$ ) (Fig.5 A-B).

O baço apresentou comprimento e área total de  $0,2\text{ mm}$  e  $0,17\text{ mm}^2$  aos 5 dae ( $4,8 \pm 0,2\text{mm}$ ), com um aumento progressivo atingindo  $1,54\text{ mm}$  e  $16,5\text{ mm}^2$  aos 53 dae ( $154 \pm 4,6\text{ mm}$ ) (Fig.6 A-B).

### 3. 3 Análise da expressão fenotípica de CD3 e CD4:

As expressões fenotípicas dos receptores linfocitários CD3 e CD4 exibiram um aumento conforme o avanço na idade das larvas e juvenis de bijupirá. No timo, os primeiros receptores linfocitários CD3 imunomarcados foram registrado no 7º dae ( $5,4 \pm 0,2\text{ mm}$ ) com  $27\% /\text{mm}^2$  de tecido tímico, tendo um maior aumento, atingindo o máximo com  $99\%/\text{mm}^2$  de receptores imunomarcados com anti-CD3 de tecido tímico aos 53 dae ( $154 \pm 4,6\text{mm}$ ). A expressão fenotípica dos receptores CD3 no rim foi destacada no 8º dia após a eclosão ( $6,5 \pm 0,1\text{mm}$ ) com uma expressão de  $10\%/\text{mm}^2$  de tecido renal, progredindo no decorrer dos dias, chegando a marcar  $32\%/\text{mm}^2$  tecido renal aos 53 dae (Fig.7 A). Imuno marcação dos receptores CD3 dos linfócitos do timo de larva de 7 dae e no rim de larva de 19 dae (Fig. 8 A-C).

A identificação da expressão fenotípica dos receptores linfocitários CD4 foi encontrada no timo somente a partir dos 7 dae, com  $5\%/\text{mm}^2$  de tecido tímico, representando o surgimento de linfócitos T4, aumentando gradativamente, chegando aos 53 dae com  $63\%/\text{mm}^2$  de linfócitos imunomarcados com anti-CD4. No rim, a população de linfócitos T4 é registrada primeiramente aos 13 dae ( $12,4 \pm 0,7\text{ mm}$ ) com  $9\%/\text{mm}^2$ , finalizando aos 53 dae com  $28\%/\text{mm}^2$  da população linfocitária CD4 do tecido renal (fig. 7 B). Imuno marcação dos receptores CD4 dos linfócitos do timo de larva de 28 dae e no rim de larva de 21 dae (Fig.8 B-D).

No baço, não foi detectado marcação positiva de receptores CD3 e CD4.

#### 4. Discussão

O sistema imune de peixes teleósteos possui uma similaridade com o de mamíferos em relação a células e moléculas, porém a morfologia desse sistema é bastante diferente principalmente pelos órgãos e as funções por eles executadas. Uma diferença crucial entre este sistema em peixes e mamíferos é a ausência de medula óssea nos peixes, uma vez que a hematopoiese ocorre na porção anterior do rim, sendo este um importante órgão linfóide. Além disso, também há ausência de gânglios linfáticos nestes animais, estrutura com importante papel na resposta imune em mamíferos inclusive humanos (Zapata *et al.* 1996).

Em relação aos órgãos linfóides em peixes, há relatos frequentes de variações na morfologia do timo, como a ausência da junção córtico-medular. No entanto, é importante reconhecer que as diferenças ocorrem principalmente entre as espécies e são idade-dependentes, sua localização foi relatado em algumas espécies com diferentes resultados (Bowden *et al.* 2005). O desenvolvimento inicial do timo em peixes tem sido estudado em diversas espécies de teleósteos (Chantanachookin 1991, Lam *et al.* 2002), como no halibut do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*) com a expansão de células tímicas, o timo se projeta para dentro da cavidade opercular (Bowden *et al.* 2005). No entanto, em outras espécies, como a carpa (*Cyprinus carpio* L.) e o robalo (*Centropomus sp.*), o seu crescimento predominante é interno (Bowden *et al.* 2005). Nesse estudo foi constatado que o timo do bijupirá é composto por uma massa uniforme de células linfóides, envolto pelo epitélio faríngeo situado na região dorsal de cada cavidade branquial.

Estruturas conhecidas como corpúsculos de Hassall são encontradas na medula do timo de mamíferos e humanos, formadas por células linfoepiteliais, unidas por desmossomos. Estas células, principalmente as mais centrais, podem se degenerar e morrer, deixando restos celulares que podem se calcificar. Contudo, suas funções são desconhecidas (Watanabe *et al.* 2005). Foram encontradas estruturas semelhantes a corpúsculos de Hassall no timo do bijupira, contrariando a maior parte dos autores que descrevem que não há estruturas de Hassall no timo de teleósteos (Hibiya 1982; Genten *et al.* 2009), embora alguns descrevem estruturas similares a corpúsculo de Hassall

(Ellaesser *et al.* 1988; Chilmonczyk 1992; Bowden *et al.* 2005). Em trutas, é possível observar em células tímicas com depósito de material hialino eosinófilo, que podem ser confundido com corpúsculo de Hassal, pois é necessário que a estrutura seja estritamente epitelial e de aspecto similar ao de catafilos de cebola (Palestro *et al.* 1998).

Estudos sobre o timo humano têm demonstrado que algumas células tímicas produzem proinsulina (Wentworth *et al.* 1992). Outras pesquisas evidenciaram que este fator proinsulina é produzido no corpúsculo de Hassal do timo de ratos (Chentoufi *et al.* 2004). Considerando a importância deste fator no crescimento de todos os vertebrados, a observação de estruturas semelhantes aos corpúsculos de Hassal no timo do bijupirá poderia estar relacionada com a produção de um fator proinsulínico que estimularia o crescimento também nesta espécie, na qual apresenta um rápido crescimento. (Liao & Leño 2007). Estudos morfológicos e fisiológicos no futuro devem ser realizados para elucidar se estas estruturas são ou não relacionadas a corpúsculos de Hassal, como descrito por Hassal (1849).

O baço, um órgão abdominal, geralmente único, não apresentou diferenciação entre polpa branca e polpa vermelha, também verificado no estudo histológico do baço de *Paralichthys olivaceus* (Liu *et al.* 2004), que ao contrário é característica do baço de mamíferos e humanos. Sua unidade funcional é o corpo elipsóides, formado por capilares rodeados por centros melanomacrofágicos (CMMs) e tecido linfóide (Ferguson 1989). A função imune do tecido linfóide esplênico tem sido controverso, principalmente por causa das diferenças encontradas entre espécies. Estudos ontogênicos em salmão do Atlântico e truta arco-íris, sugerem que o baço não é essencial para a maturação imunológica e que os linfócitos do timo e do rim anterior são membros de muitas funções imunes enquanto o baço é um órgão ainda rudimentar (Razquin *et al.* 1990).

A ontogênese é uma sequência de eventos moleculares e celulares regulados pelo tempo e espaço, conduzindo o desenvolvimento funcional de um organismo (Rombout *et al.* 2005). De acordo com estudos de ontogênese realizados, fica claro que os peixes jovens utilizam mecanismos de defesa inato durante as primeiras semanas/meses (dependendo da espécie) do seu desenvolvimento. Devido a essas constatações, pesquisas ontogênicas são importantes para entender caminhos evolutivos



e -mecanismos de defesa dos peixes em idade precoce contra patógenos (Rombout *et al.* 2005). A importância de pesquisas com ontogênese citadas ressalta a necessidade de estudos com espécies ainda não exploradas, como é o caso do bijupirá, que ainda não há relatos na literatura sobre o desenvolvimento do sistema imune, portanto se torna relevante a ontogênese dessa espécie, bem como o presente estudo.

A ontogênese dos tecidos linfóides relatado, em estudos anteriores com outras espécies de peixes marinhos encontra-se resumido na Tabela 1 (Cunha *et al.* 2008).

Tabela 1. Tempo de aparecimento, em dias após a eclosão de células hematopoiéticas no baço, rim e timo em peixes marinhos.

Espécies	Referências	Rim	Baço	Timo
<i>Scophthalmus maximus</i>	Padrós & Crespo (1996)	0	9-10	16
<i>Sebastiscus marmoratus</i>	Nakanishi (1991)	0	0	7
<i>Sparus aurata</i>	Jósefson & Tatner (1993)	5	12	29
<i>Seriola quinqueradiata</i>	Chantanachookhin <i>et al.</i> (1991)	3	3	11
<i>Pagrus major</i>	Chantanachookhin <i>et al.</i> (1991)	0	3	11
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Chantanachookhin <i>et al.</i> (1991)	7	8	10
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Liu <i>et al.</i> 2004.	1	8	15
<i>Solea senegalensis</i>	Cunha <i>et al.</i> 2008.	6	6	9
<i>Rachycentron canadum</i>	Esse estudo	1	5	7

Em comparação com outros teleósteos, o desenvolvimento dos órgãos linfóides no bijupira foi semelhante com alguns peixes marinhos citados. O rim no bijupirá já está presente no primeiro dia após eclosão, com apenas a presença de poucos túbulos renais, no mesmo tempo encontrado em *Paralichthys olivaceus*, onde a massa de tecido hematopoiético aumentou gradativamente com a idade do peixe (Liu *et al.* 2004).

Os órgãos linfóides de bijupirá surgiram em uma sequência, destacando primeiramente o rim anterior, baço e timo, de acordo com o encontrado em peixes marinhos e outros teleósteos, como linguado, douradas (*Sparus aurata* L.), yellowtail (*Seriola dumerili*) e pargo (*Pagrus major*) (Chantanachookhin *et al.* 1991, Josefsson *et al.* 1993, Padros & Crespo 1996; Liu *et al.* 2004), mas diferente em peixes de água doce como, salmão, truta e carpa (Grace & Manning 1980; Botham & Manning 1981).

Durante a ontogenia do sistema imune foi possível estabelecer o momento da repovoação de linfócitos T no rim anterior. Os linfócitos que migram do rim anterior para o timo adquirem receptores específicos de células T (timo-dependente) (Nielsen & Esteve-Gassent 2006), retornando ao rim anterior e mantendo as atividades imunes dos linfócitos B e T, como foi observado neste trabalho através da análise da expressão fenotípica dos receptores CD3 e CD4. A partir desse momento, sabe-se que o timo involui na maioria das espécies de peixes, como na época da maturidade sexual (Fishelson 1995), e também relacionado a outros fatores como idade, a estação, o stress ambiental e ciclos hormonais também podem afetar a involução do timo (Press & Evensen 1999).

Apesar de larvas de peixes estarem inicialmente protegidas por várias substâncias imunológicas inatas que são transferidas aos ovos durante a vitelogênese e que os juvenis dependem de seus mecanismos de defesa inata (Magnadottir *et al.* 2005, Mulero *et al.* 2008), a prevenção com o uso de vacina é de grande importância para o desenvolvimento de cultivos da aquicultura. Estudos morfológicos sobre o desenvolvimento do sistema imune de peixes têm demonstrado que o mecanismo do sistema imune entre os teleósteos são muito semelhantes, com diferenças apenas em relação ao momento do desenvolvimento do sistema imune adquirido (Mulero *et al.* 2007). No presente estudo, através da imunomarcção dos receptores CD4, foi possível estabelecer o momento em que o sistema imune específico se tornou funcional, devido a presença de linfócitos T4 no timo aos 7 dias após a eclosão e no rim aos 13 dae, indicando as atividades funcionais dos linfócitos T4 e fundamentalmente a presença da memória imunológica. A não detecção de CD3 e CD4 em linfócitos do baço possivelmente esteja relacionado ao fato que este órgão possua população predominante de linfócitos B e poucos linfócitos T, insuficiente para que a imunistoquímica se torne positiva (Mishell & Dutton 1967).

Alguns autores relatam que devido a falta de marcadores adequados para linfócitos T em peixes, as caracterizações e funcionalidades das populações de células T ainda não foram totalmente definidas em teleósteos (Laing *et al.* 2006), no entanto este estudo constata que é possível a marcação e caracterização de linfócitos T em teleósteos, com o uso de anticorpo monoclonal com reatividade cruzada, usado também

para identificar novos anticorpos no estudo de populações de células T em diferentes espécies animais (Conrad *et al.* 2007).

O uso de reatividade cruzada só é possível, pois moléculas presentes nos receptores T de algumas espécies, se conservaram durante a evolução (Conrad *et al.* 2007). Como exemplo em pesquisa com genes equivalentes (CD4, CD4REL e LAG-3) foram identificados nos genomas de ectotérmicos, como, *Danio rerio* e *Oncorhynchus mykiss* para investigar as relações evolutivas que deram origem a CD4 de mamíferos (Laing *et al.* 2006).

Neste trabalho foi demonstrada a utilidade da histologia clássica e imunohistoquímica para avaliar o desenvolvimento ontogênico do bijupirá, ferramentas estas de fácil acesso e de simplicidade técnica, que contribuíram para elaboração de informações necessárias sobre seu sistema imune, contribuindo para seu cultivo e futuras pesquisas.

## 5. Conclusão

As informações sobre o tempo de aparecimento dos principais órgãos linfóides apresentados neste estudo contribuem para a caracterização do sistema imunológico e estabelecimento da capacidade imunológica do bijupirá. Foi identificado o surgimento do rim anterior no primeiro dia após a eclosão, o baço surgiu no 5º dia após a eclosão e o timo no 7º dae. A presença da população linfóide geral foi identificada através do anticorpo anti-CD3, verificando a presença de receptores CD3<sup>+</sup> no rim anterior no 8º dae e no timo no 7º dae. O desenvolvimento da imunidade específica associada à capacidade de memória imunológica relacionado à presença de linfócito T4 (com receptores CD4<sup>+</sup>), foi detectado no timo aos 7 dias após a eclosão (dae) e no rim aos 13 dae, definindo a sua capacidade de responder a antígenos específicos. Estes conhecimentos serão úteis na elaboração de métodos preventivos para a proteção contra doenças, como o uso de vacinas. Em conclusão, a ontogênese das larvas e juvenis de bijupirá descrito neste estudo, indica que os primeiros estágios larvais são caracterizados por um rápido desenvolvimento dos órgãos e da atividade funcional do sistema imunológico.

## 6. Referências Bibliográficas

- ALDERMAN, DJ & TS HASTINGS. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance – potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 33: 139-155.
- BENETTI, DD, R ORHUNM, B SARDENBERG, B O'HANLON, A WELCH, R HOENIG, I ZINK, JÁ RIVERA, B DENLINGER, D BACCOAT, K PALMER & F CAVALIN. 2008. Advances in hatchery and grow-out technology of cobia *Rachycentron canadum* (Linnaeus). *Aquacult. Res.*, 39:701-711.
- BOTHAM, JW & MJ MANNING. 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and the ontogenetic development of allograft reactivity. *J Fish Biol.* 19:403–14.
- BOWDEN, T J, P COOK & JH ROMBOUT. 2005. Development and function of the thymus in teleosts. *Fish shellfish immunol.*, 19:413-27.
- BROWN-PETERSON, NJ, RM OVERTREET, JM LOTZ, JS FRANKS & KM BURNS. 2001. Reproductive biology of cobia, *Rachycentron canadum*, from coastal waters of the southern United States. *Fish Bull*, 99 (15-28).
- CHANTANACHOOKHIN, C, T SEIKAI & M TANAKA. 1991. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture*. 9:143–55.
- CHILMONCZYK, S. 1992. The Thymus in fish: development and possible function in the immune response. *Annual. Rev. Fish Diseases*, 181-200.
- CHENTOUFI, AA, M PALUMBO & C POLYCHRONAKOS. 2004. Proinsulin expression by Hassall's Corpuscles in the Mouse Thymus. *Diabetes*, 53:354–359.
- CHOU, R, MS SU & HY CHEN. 2001. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, 193:81-89.
- CONRAD, M, W DAVIS & B KOOP. 2007. TCR and CD3 Antibody Cross-Reactivity in 44 Species. Cytometry. Part A: *The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 71:925-33.

- GRACE, MF & MJ MANNING. 1980. Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Rich. 1836. *Dev Comp Immunol.*, 4:255–64.
- CRAIG, SR, MH SCHWARZ & E MCLEAN, 2006. Juvenile coho ( *Rachycentron canadum* ) can utilize a wide range of protein and lipid levels without impacts on production characteristics. *Aquaculture*, 261:384–391.
- CUNHA, MC, P MAKRIDIS, F SOARES, P RODRIGUES & MT DINIS. 2008. Timing of Appearance of Lymphoid Cells During Early Development of Senegalese Sole, *Solea senegalensis* Kaup. *J. World Aquacul. Soc.*, 39:436-439.
- DANNEVING, DH, T LANDSVERK. 1995. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cell Tissue Res.*, 282(1):41-48.
- ELLSAESSER, CF, JE BLY & LW CLEM. 1988. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity. The thymus of the channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.*, 12:787-799.
- FERGUSON, HW. 1989. Systemic Pathology of Fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts (Iowa State University Press, Ames), p5-103- *Espenes, A., Press, C.M.L.*
- FISHELSON, L. 1995. Cytological and morphological ontogenesis and involution of the thymus in cichlid fishes (Cichlidae, Teleostei). *J. Morphol.*, 223:175–90.
- GUNDERSEN, HJ & EB JENSEN. 1985. Stereological estimation of the volume weighted mean volume of arbitrary particles observed on random sections. *J. Microsc.*, 138:127–142.
- HAFTER, E. 1952 Histological age changes in the thymus of the teleost *Astyanax*. *J. Morphol.*, 90:555–82.
- HASSAL, AH. 1849. The microscopic anatomy of the human body in health and disease. London: Samuel Highly.
- HOLT, GJ, CK FAULK & MH SCHWARZ. 2007. A review of the larviculture of coho *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish. *Aquaculture*, 268:181-187.
- JOSEFSSON, S & MF TATNER. 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish shellfish immunol.*, 3:35–49.

- KLOSTERHOFF, MC & LA ROMANO. 2012. Pulse granulomas detected in peritoneum of a wild rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* with acanthocephalan infections. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 32(2):63-67.
- LAM, SH, HL CHUA, Z GONG, Z WEN, TJ LAM & YM SIN. 2002. Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. *Dev. Dynamics.*, 225:87-94.
- LAING, KJ, JJ ZOU, MK PURCELL, R PHILLIPS, CJ SECOMBES & JD HANSEN. 2006. Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in addition to lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol.*, 177:3939-3951
- LIAO, IC & EM LEAÑO. 2007. Cobia aquaculture: research, development and commercial production. Taiwan: Asian Fisheries Society, 178p.
- LIU, Y, S ZHANG, G JIANG, D YANG, J LIAN & Y YANG. 2004. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. *Fish Shellfish Immunol.*, 16:621-32.
- LU, QZ. 1998. The composition of immune cells in head kidney of grass carp (*Ctenophrygodon idellus*) together with ontogenic change in their numbers. *Zool. Res.*, 19(1):11-16.
- MAGNADOTTIR, B, S LANGE, S GUDMUNDSDOTTIR, J BOGWALD & RA DALMO. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 19:429-439.
- MALE, DK, J BROSTOFF, DB ROITT & I ROTH. 2006. Elsevier Health Sciences, 7th ed. Canada: Mosby Elsevier, *Immunology*, p.58-69, 552.
- MARSDEN, MJ, LM VAUGHAN, TJ FOSTER & CJ SECOMBES. 1996. A Live *Aeromonas salmonicida* vaccine for furunculosis T. J. preferentially stimulates T-Cell responses relative to B-Cell responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Infect Immunity*, Sept:3863-3869
- MISHELL, RI & RW DUTTON. 1967. Immunization of dissociated spleen cell cultures from normal mice. *J. Exp. Med.*, 126:423-424.
- MULERO, I, A GARCÍA-AYALA, J MESEGUER, V MULERO. 2007. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a minireview. *Aquaculture*, 268:244-250.

- MULERO, I, MP SEPULCRE, I FUENTES, I GARCIA-ALCAZAR, J MESEGUER, A GARCIA-AYALA & V MULERO. 2008. Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence. *Mol. Immunol.*, 45:2981-2989.
- NAKANISHI, T. 1991. Ontogeny of the immune system in *Sebastes marmoratus* histogenesis of the lymphoid organs and effects of thymectomy. *Environ. Biol. fish.*, 30:135–145.
- STEINER, LA, N DANILOVA & CE WILLETT. 2004. The immune system in zebrafish, in *Molecular Biology of B Cells*, 3rd edition, F. W. Alt, T.Honjo, M.S. Neuberger, ed. Elsevier Academic Press, London. pp 231-245 (556).
- NIELSEN, ME & MD ESTEVE-GASSENT. 2006. The eel immune system: present knowledge and the need for research. *J. Fish Dis.*, 29:65-78.
- OZÓRIO, R, Y AVNIMELECH & N CASTAGNOLLI. 2004. Sistemas intensivos fechados de produção de peixes. In: Tópicos especiais em piscicultura de água doce Tropical Intensiva. SP, Brasil. 2:7-23.
- PADROS, F & S CRESPO. 1996. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquaculture*, 144:1–16.
- PALESTRO, G, D NOVERO, M GEUNA, R CHIARLE, L CHIUSA, M PAGANO & A PICH. 1998. Role of the perivascular epithelium in the histogenesis of Hassall's Corpuscles: A Morphologic and immunohistological study. *Inter. J. Surgical Pathol.*, 6: 213 - 221.
- PRESS, CM & O EVENSEN. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.*, 9(4):309-318.
- RAZQUIN, BE, A CASTILLO, P LÓPEZ-FIERRO, F ÁLVAREZ, A ZAPATA & AJ VILLENA. 1990. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson: an immuno and enzyme-histochemical study. *J. Fish Biol.*, 36:159-173.
- ROMANO, LA, MD FERDER, IY STELLA, F INSERRA & L FERDER. 1996. High correlation in renal tissue between computed image analysis and classical morphometric analysis. *J. Histotechnol.*, 19:121- 123.



- ROMANO, LA, 2010. El sistema Imune Inespecífico de los Peces. Em: Patología Sanidade de organismos Acuáticos. ABRAPOA. Silva –Souza A.T., Perez Lizama M. A., Takemoto R. M., (Editores) 550.
- ROMBOUT, JHWM, HBT HUTTENHUIS, S PICCHIETTI, G SCAPIGLIATI. 2005. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.*19:441-455.
- RUBIO-GODOY, M. 2010. Inmunología de los peces óseos: Revisión. *Revista Mexicana Ciencias Pecuária*, 1:47-57.
- STEINER, LA, CE WILLETT & N DANILOVA. 2004. The zebrafish immune system. *Molecular Biology of B Cells*.
- SHAFFER, RV & EL NAKAMURA, 1989. Synopsis of biological data on the Cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae). NOAA Technical Report NMFS 82. U.S. Department of Commerce, Washington, DC.
- WATANABE, N, Y WANG, HK LEE, T ITO, Y WANG, W CAO & Y LIU. 2005. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 436:1181-85.
- WEIBEL, ER & DM GOMEZ. 1962. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Scienc*, 137:577–585.
- WEIBEL, ER. 1980. Stereological Methods. London: Academic, 2:253–257.
- WENTWORTH, BM, C RHODES, B SCHNETZLER, DJ GROSS, PA HALBAN & L VILLA-KOMAROFF. 1992. The ratio of mouse insulin I: insulin II does not reflect that of the corresponding preproinsulin mRNAs. *Mol. Cell Endocrinol.*, 86:177–186
- ZAPATA, A, A CHIBA & A VARAS. 1996. Cells and tissues of the immune system of Fish. In: The fish immune system: Organism pathogen and environment. G Iwama and T Nakanishi (Eds.) Academic Press. New York. p. 1-62.
- ZAPATA, A.; B DIEZ, T CEJALVO, C GUTIERREZ-DE FRÍAS & A CORTÉS. 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.*,20:126-136.

Figuras

Fig. 1

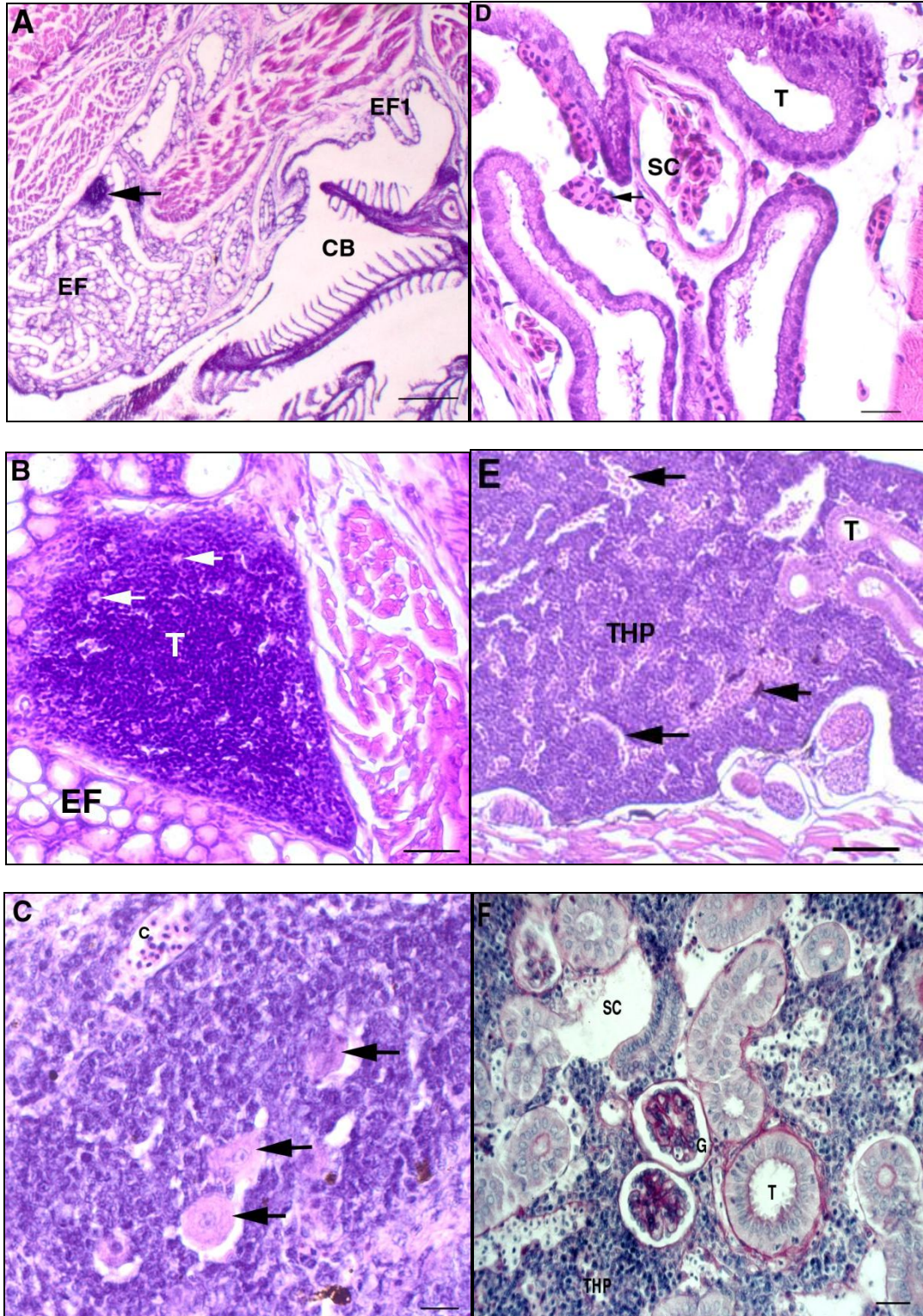


Figura 1. Desenvolvimento do timo (A, B e C) e do rim (D, E e F) de bijupirá *Rachycentron canadum*. **A:** Larva de 3 dae, onde se observa a estrutura tímica (seta), rodeado pelo epitélio faríngeo (EF). Este epitélio origina-se do revestimento da câmara branquial (CB) EF1. HE (Barra = 10 µm). **B:** Larva de 28 dae, onde se observa o timo (T) envolto pelo epitélio faríngeo (EF) com estruturas similares à corpúsculos de Hassal (seta). H-E (Barra = 20 µm.) **C:** Timo de um animal de 53 dae, onde se observa linfócitos, capilares (C) e estruturas semelhantes à corpúsculos de Hassal (seta). HE (Barra = 50 µm). **D:** Rim de larva de 2 dae, onde se observa túbulos (T) , sinusóides capilares (SC) e eritrócitos agrupados (seta). Não se observa células linfohematopoiéticas. HE (Barra = 20 µm). **E:** Rim de larva de 19 dae com túbulos (T) abundante tecido linfohematopoiético (THP), capilares sinusoides (seta longa) e melanomacrofagos (seta curta). HE (Barra = 20 µm). **F:** Rim de larva de 53 dae onde se observa túbulos (T), glomérulos (G), capilares sinusóides (SC) e abundante tecido linfohematopoiético (THP). PAS (Barra = 20 µm).

Fig.2

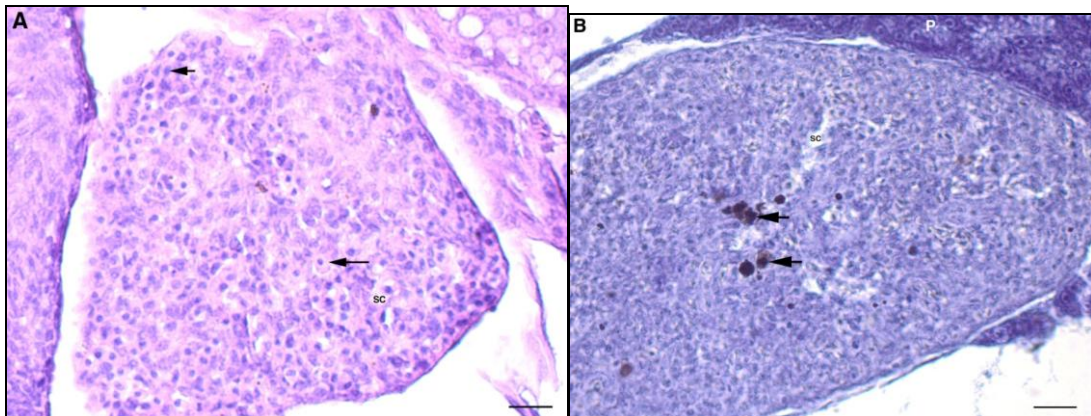


Figura 2. Baço do bijupirá *Rachycentron canadum*. A: Baço de larva de 19 dae com linfócitos agrupados (seta curta), macrófagos (seta longa) e capilares sinusóides (SC). HE (Barra = 50  $\mu$ m). B: Baço de larva de 28 dae rodeado de tecido pancreático exócrino (P) com melanomacrófagos (setas). Coloração azul de Khumm (Barra = 50  $\mu$ m).

Fig.3

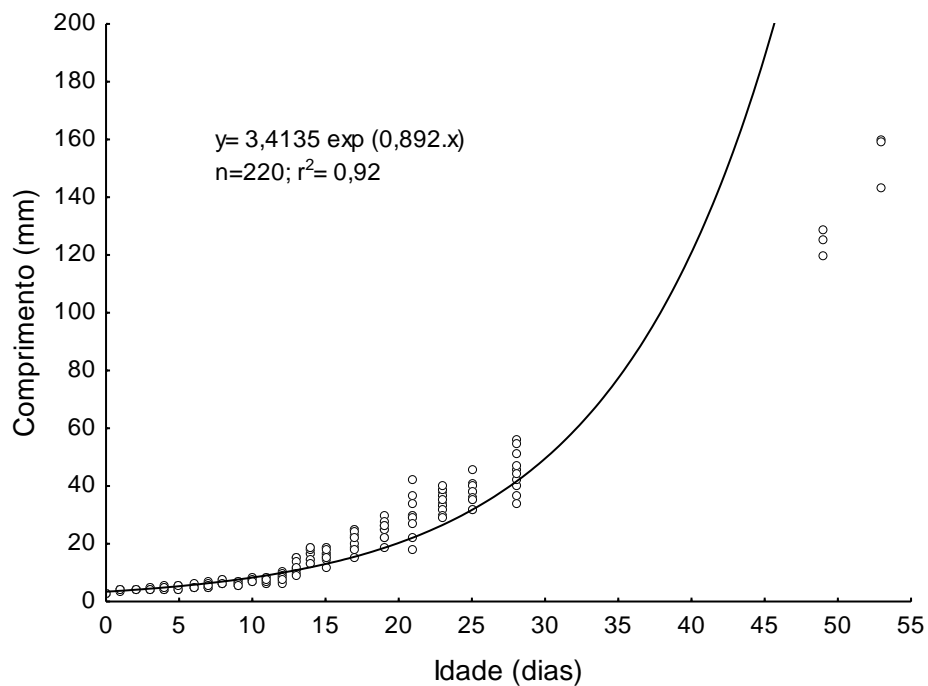


Figura 3. Comprimento total de larvas e juvenis de bijupirá *Rachycentron canadum*.

Fig.4

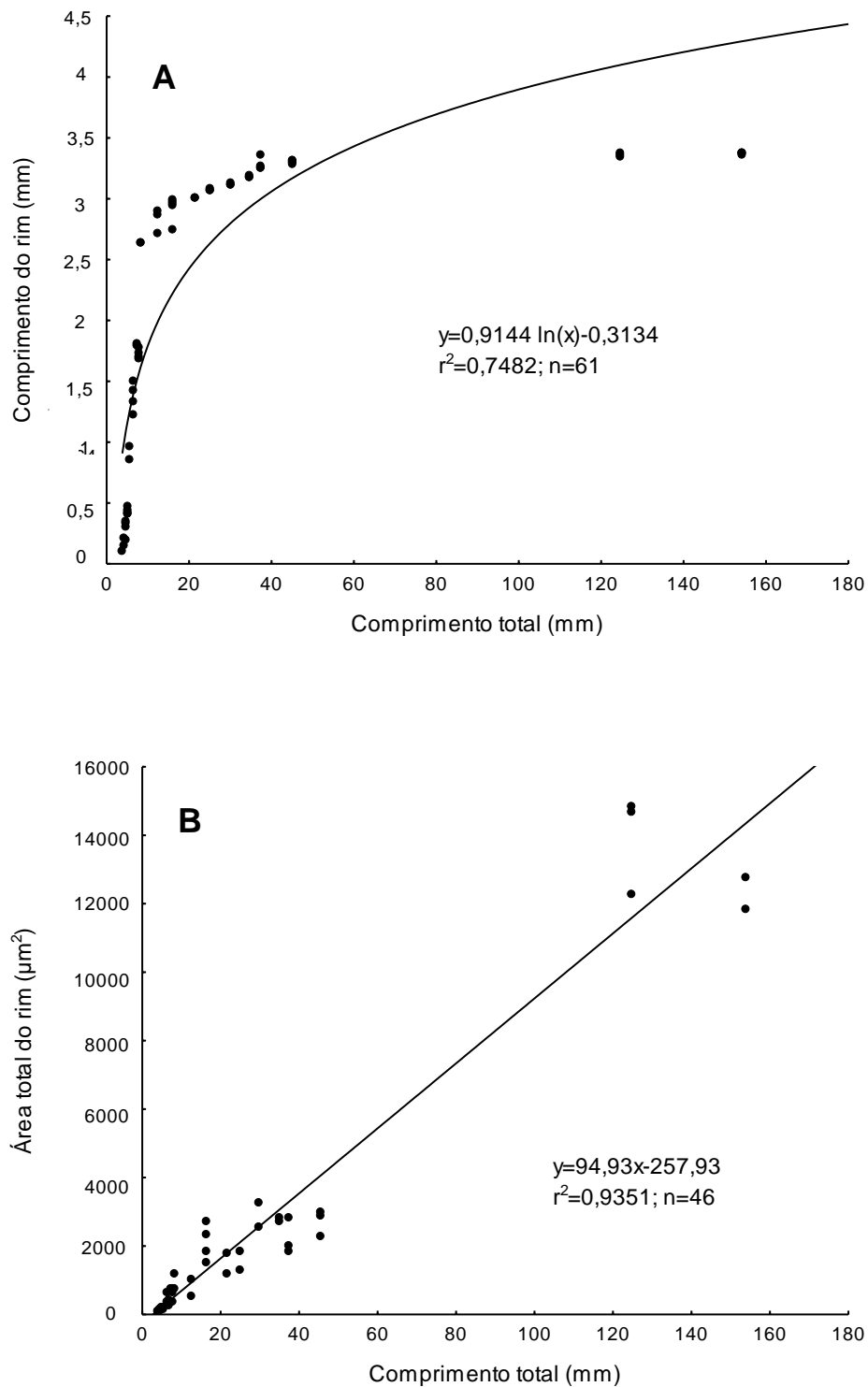


Figura 4. Crescimento do rim de larvas e juvenis do bijupirá *Rachycentron canadum*. (A) Comprimento do rim. (B) Área do rim.



Fig.5

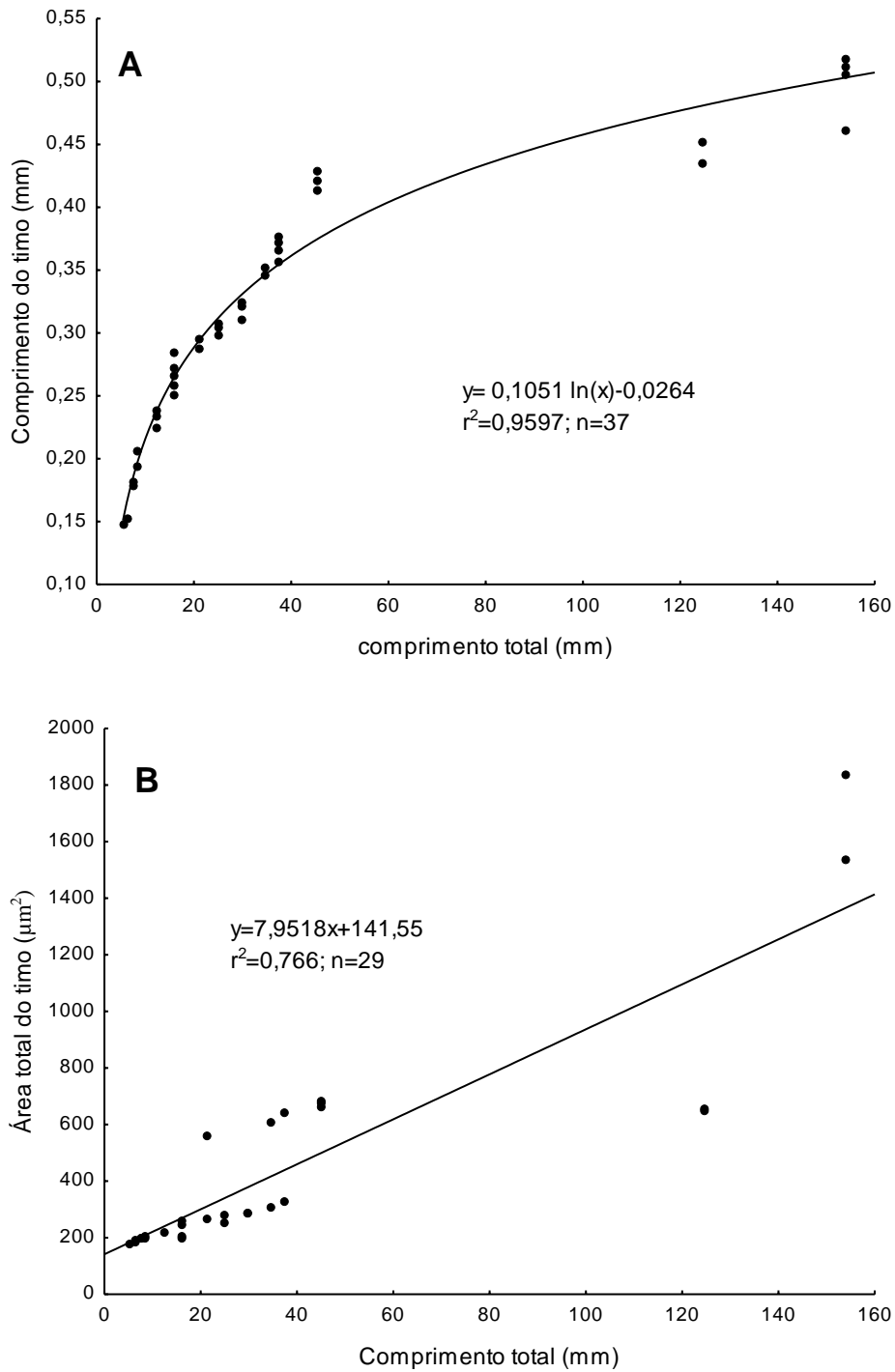


Figura 5. Crescimento do timo de larvas e juvenis do bijupirá *Rachycentron canadum*. (A) Comprimento do timo. (B) Área do timo.

Fig.6

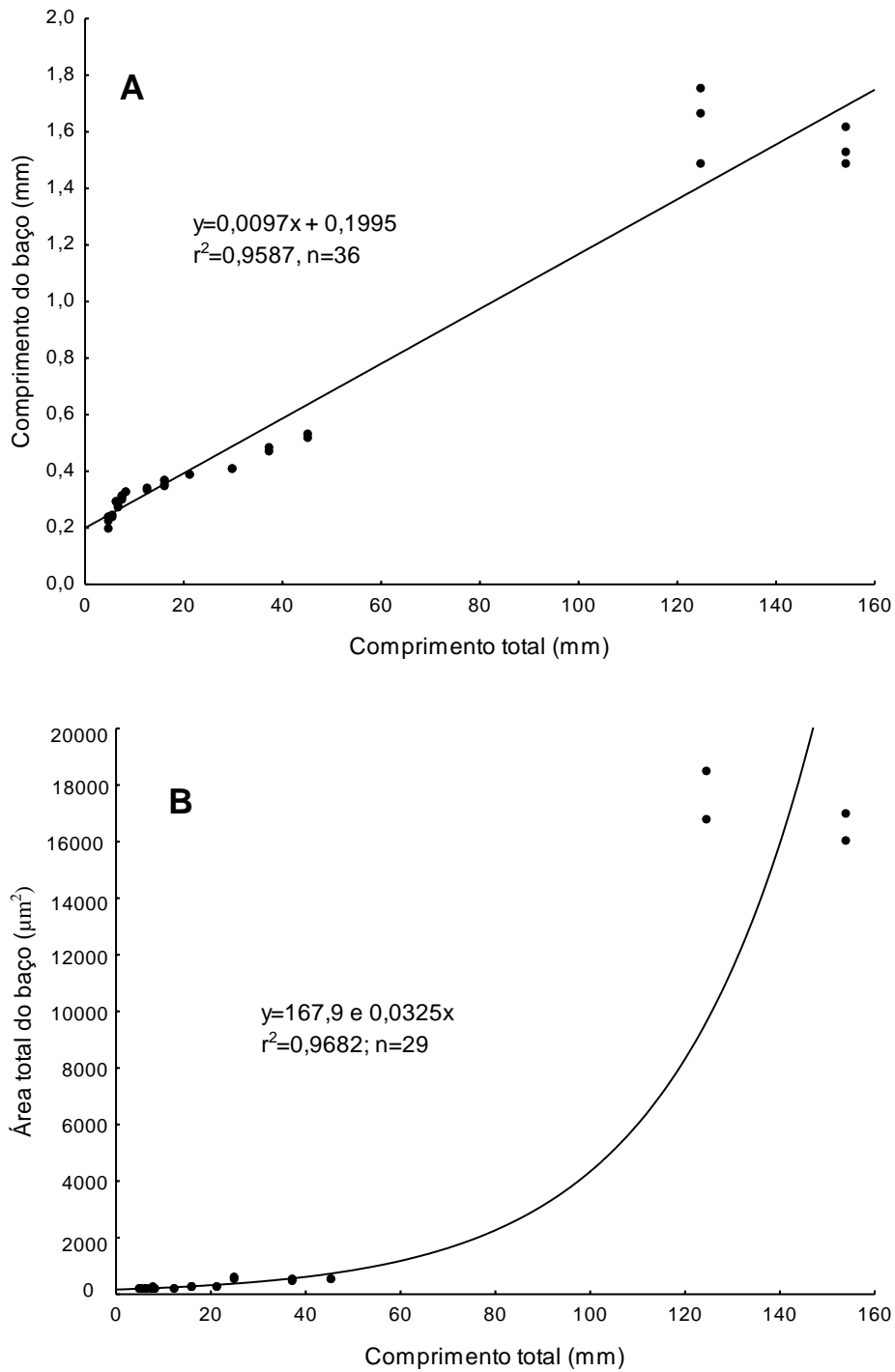


Figura 6. Crescimento do baço de larvas e juvenis do bijupirá *Rachycentron canadum*. (A) Comprimento do baço. (B) Área do baço.

Fig.7

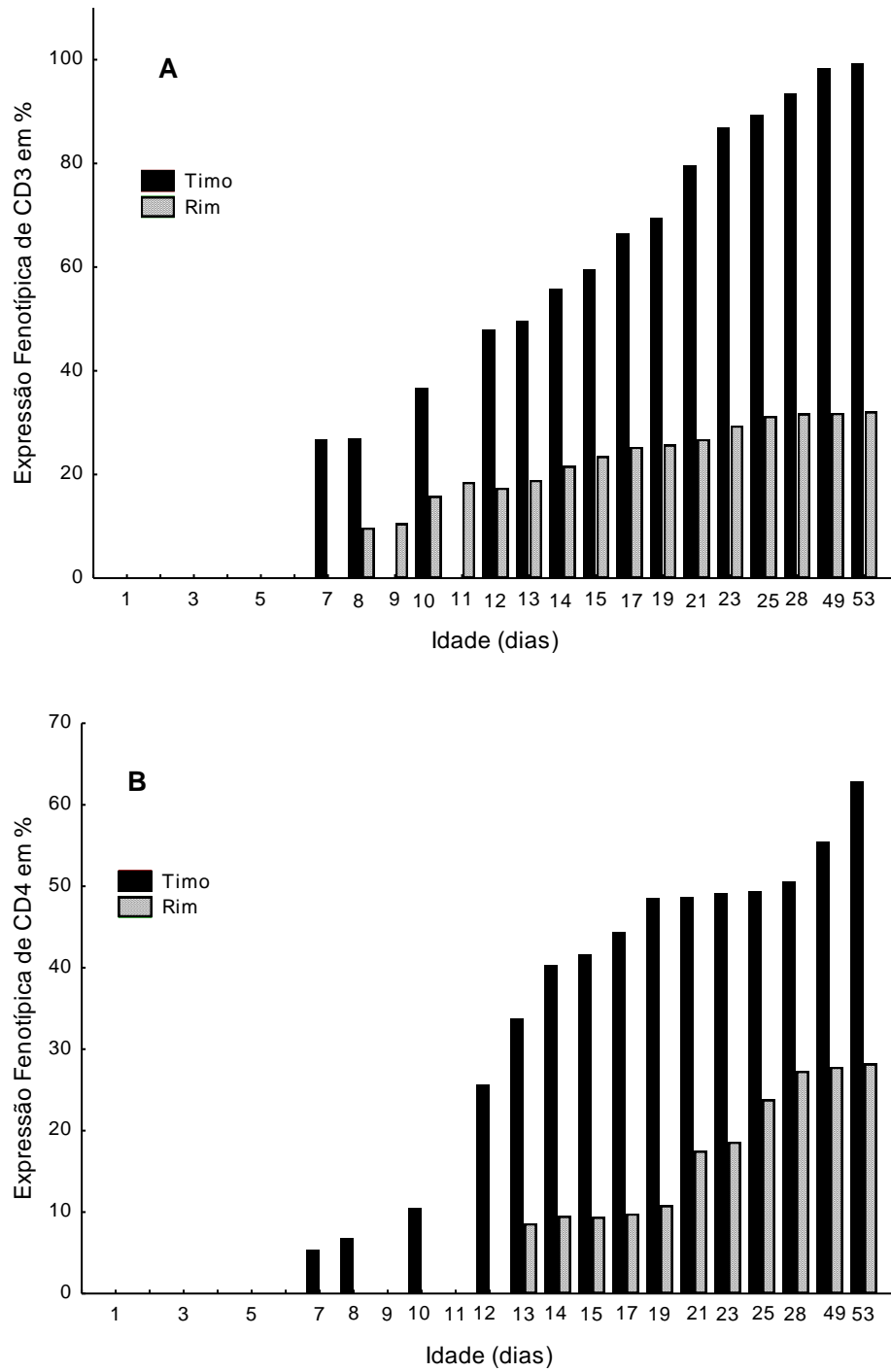


Figura 7. Expressão fenotípica de CD3 (A) e CD4 (B) em linfócitos presente no timo e no rim do bijupirá *Rachycentron canadum*.



Fig.8

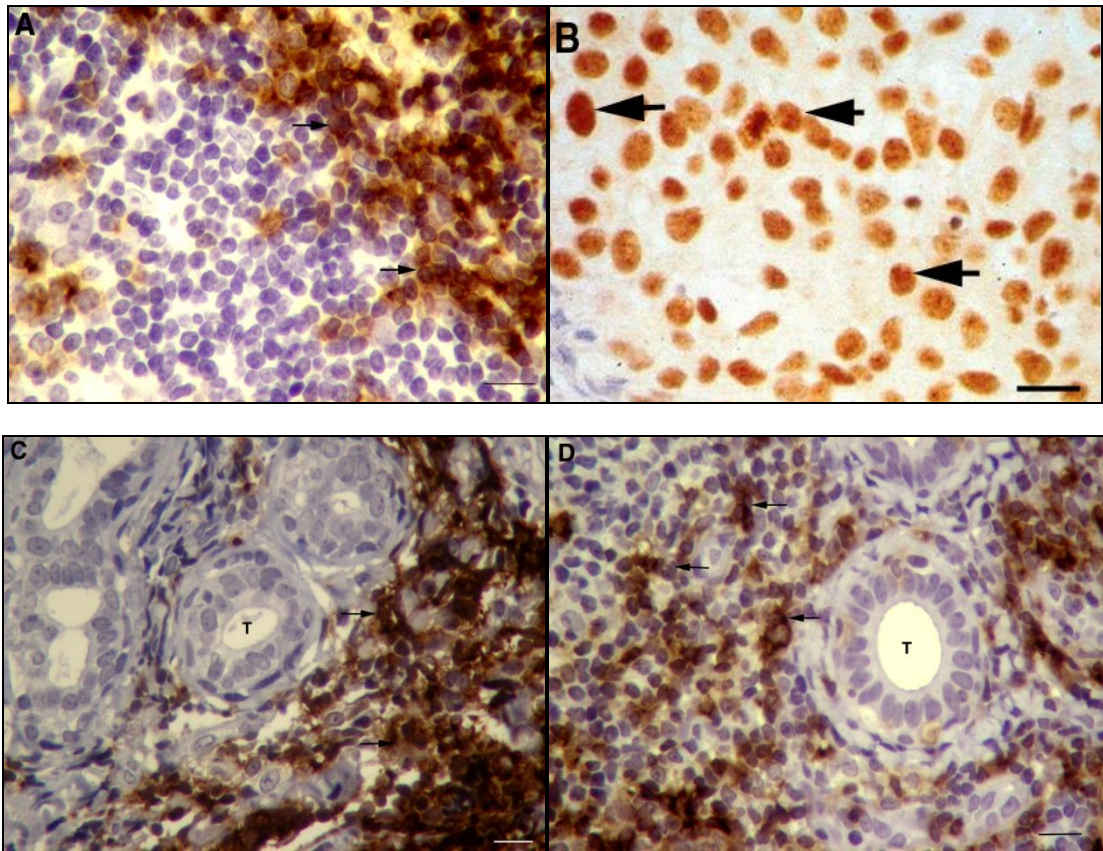


Figura 8. Imunomarcção dos receptores CD3 e CD4 dos linfócitos do bijupirá *Rachycentron canadum*. **A:** Timo de larva de 7 dias após eclosão (dae) com linfócitos marcados com anti -CD3 (seta). Anti-CD3 (Barra= 50  $\mu$ m). **B:** Timo de larva de 28 dae com linfócitos marcados com anti-CD4 (setas) Anti CD4 (Barra = 50  $\mu$ m). **C:** Rim de larva de 19 dias após a eclosão com tecido linfohematopoiético que envolvem os túbulos (T) linfócitos marcados com anti CD3 (seta). Anti CD3 (Barra = 50  $\mu$ m). **D:** Rim de larva de 21 dias após a eclosão onde encontra-se tecido linfohematopoiético que rodeiam os túbulos (T) linfócitos marcados com anti-CD4 (seta). Anti-CD4 (Barra = 50  $\mu$ m).