

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG**  
**INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO SANGUE, DA ONTOGENIA DOS  
ÓRGÃOS LINFÓIDES E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES  
RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE DO LINGUADO *Paralichthys  
orbignyanus***

**EMELINE PEREIRA GUSMÃO**

**Rio Grande - Brasil**

**Maio - 2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**  
**TESE DE DOUTORADO**

**DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO SANGUE E DA ONTOGENIA DOS**  
**ÓRGÃOS LINFÓIDES E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES**  
**RELACIONADOS AO SISTEMA IMUNE DO LINGUADO *Paralichthys***  
***orbignyanus***

**Emeline Pereira Gusmão**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Luis Alberto Romano  
Co-orientador: Prof. Dr. Luís André Sampaio

**Rio Grande - Brasil**  
**Maio - 2014**

**ATA**

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

## SUMÁRIO

<b>Dedicatória</b>	vii
<b>Agradecimentos</b>	viii
<b>Resumo geral</b>	ix
<b>General abstract</b>	ix
<b>Introdução geral</b>	1
1. Linguado <i>Paralichthys orbignyanus</i>	1
2. Sistema imune	3
2.1. Sistema imune inato ou inespecífico	5
2.2. Sistema imune adaptativo ou específico	8
2.2.1. Imunidade específica humoral	10
2.2.2. Imunidade específica celular	10
2.3. Órgãos linfóides	14
2.4. Ontogenia do sistema imune	16
3. Sistema circulatório	17
3.1. Sangue	17
3.1.1. Células sanguíneas	17
3.1.2. Hematopoiese	19
<b>Objetivos</b>	20
Objetivo geral	20
Objetivos específicos	20
<b>Referências bibliográficas</b>	21
<b>Capítulo 1. Development of the lymphoid organs of larvae and juvenile of the Brazilian flounder <i>Paralichthys orbignyanus</i> (Teleostei: Paralichthyidae).</b>	25
Abstract	26
Materials and Methods	28
Results	28
Discussion	29
Acknowledgements	32
References	32

<b>Capítulo 2. Expression of immune-related genes during the early stages of Brazilian flounder (<i>Paralichthys orbignyanus</i>) development.</b>	38
Abstract	39
1. Introduction	40
2. Materials and methods	43
2.1. Larval rearing	43
2.2. Gene expression analysis	43
2.2.1. Synthesis of the complementary DNA (cDNA)	43
2.2.2. Isolation of immune-related genes	44
2.2.3. Gene expressions	45
2.2.4. Statistical analysis	45
3. Results	45
4. Discussion	46
References	50
<b>Capítulo 3. Morphological characterization of blood cells in adults of the Brazilian flounder <i>Paralichthys orbignyanus</i> (Teleostei: Paralichthyidae).</b>	59
Abstract	60
1. Introduction	60
2. Materials and Methods	61
3. Results	62
3.1. Erythrocytic series	62
3.2. Leucocytes	63
3.2.1. Granulocytic series	63
3.2.2. Agranulocytic series	63
3.3. Thrombocytic series	63
4. Discussion	64
Acknowledgements	68
Literature Cited	68
<b>Discussão geral</b>	73
<b>Conclusão geral</b>	79
<b>Referências</b>	80

**Aos meus pais, Luiz e Mara.**

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Romano, com quem tive oportunidade de aprender muito, tanto como profissional quanto como pessoa, e que me fez conhecer os incríveis desafios da patologia com grande entusiasmo.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Luís André Sampaio, sem o qual eu não estaria concluindo esta etapa, e a quem serei eternamente grata pela grande ajuda, orientação, paciência e perseverança dedicadas a mim durante todos esses anos de FURG, especialmente nos últimos anos e neste doutorado. Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Luis Fernandes Marins, o Luf, a quem eu tenho profunda admiração, e me fez novamente descobrir a paixão pelos desafios na ciência através da biologia molecular. Obrigada por toda a paciência, boa vontade e disposição em me ajudar durante este doutorado!

A todos os membros da banca, incluindo o Prof. Danilo Streit e o Dr. Ricardo Rodrigues, pelas críticas e sugestões que vierem a apresentar e por dedicarem seu tempo para contribuir com seus conhecimentos para esta tese.

Agradeço aos meus pais Luiz e Mara, que sempre foram meu apoio mesmo diante de todas as dificuldades. Obrigada pelo exemplo de vida e amor incondicional!

Ao Jacques, que foi grandemente responsável pela minha motivação para terminar este doutorado, e que com seu amor e carinho tornaram essa etapa final muito mais agradável, alegre e possível.

Aos colegas do LIPOA, do LAPEM e do Laboratório de BIOMOL que ajudaram de alguma forma a realizar este trabalho. Sem a incansável ajuda de vocês, essa tese não seria possível! Especialmente à Marta, Bianca, Okamoto e Márcio!

A todos os meus colegas e amigos da Estação Marinha de Aquicultura. São muitos nomes para serem citados, mas todos de alguma forma contribuíram muito na minha caminhada durante todos esses anos de graduação, mestrado e doutorado. Aos que já foram embora, e aos que ainda estão por lá, agradeço de coração por toda a alegria e companheirismo!

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram presentes (ou nem tanto quanto gostaríamos, mas sempre presentes de coração!) durante esses últimos anos da minha vida, apoiando ou apenas ajudando com alegrias e conversas durante a fase mais difícil pela qual passei. É nessas horas que se percebe o valor da amizade. Muito obrigada a vocês!



## 1           **RESUMO GERAL**

2           Este estudo descreve a ontogenia do sistema imune inato e adaptativo do linguado  
3 *Paralichthys orbignyanus* e analisa a expressão de genes RAG1, CD3, CD4-2 e IL-1 $\beta$ ,  
4 relacionados ao desenvolvimento do sistema imune em larvas e juvenis de *P. orbignyanus*,  
5 e a morfologia do sangue periférico. A larvicultura foi realizada no Laboratório de  
6 Piscicultura Estuarina e Marinha da Universidade Federal do Rio Grande (EMA – FURG).  
7 O rim apareceu 1 dia após a eclosão (dae), o timo aos 5 dae e o baço aos 10 dae, com  
8 células linfóides observadas em torno dos 25 dae. A expressão do gene RAG1 seguiu o  
9 aparecimento do timo, e os níveis de mRNA de CD3 e CD4-2 aumentaram após 30 dae.  
10 Um aumento nos níveis da citocina IL-1 $\beta$  foi observado aos 30 dae. O sangue de *P.*  
11 *orbignyanus* segue basicamente o mesmo padrão de outros vertebrados (eritrócitos,  
12 leucócitos e trombócitos). Estes resultados sugerem que, a partir dos 25-30 dae, o sistema  
13 imune do linguado pode apresentar memória imunológica, podendo-se utilizar  
14 imunoestimulantes e vacinação para melhorar as taxas de sobrevivência durante a  
15 larvicultura, bem como o perfil normal das células sanguíneas pode servir de base para a  
16 futura análise de condições patológicas.

## 17 18           **GENERAL ABSTRACT**

19           This study aimed to describe the ontogeny of the innate and adaptative immune  
20 systems and analyze the expression of immune-related genes during the development of  
21 larvae and juvenile *Paralichthys orbignyanus*, as well as the morphological features of  
22 the blood, to improve the cultivation of this species in captivity. Larvae provenient from  
23 artificial fertiliation were obtained at the Laboratory of Estuarine and Marine Fish Culture  
24 of the Federal University of Rio Grande (EMA – FURG). The kidney was observed at 1  
25 day after hatching (dah), the thymus at 5 dah and the spleen at 10 dah, with lymphoid  
26 cells being observed in the animals after 25 dah. The expression of RAG1 proteins  
27 followed the appearance of the thymus, and CD3 and CD4-2 mRNA levels increased after  
28 30 dah. An increase in the levels of the cytokine IL-1 $\beta$  was observed at 30 dah. The blood  
29 of *P. orbignyanus* follows the hematological pattern of other vertebrates, with  
30 erythrocytes, leucocytes and thrombocytes. These results suggest that after 25-30 dah the  
31 immune system of this species may present immunological memory and larvae and/or  
32 juvenile can be immunostimulated or vaccinated to increase survival in early stages of  
33 development, as well as the blood profile being used as a basic information for further  
34 pathological analysis.

## 35 INTRODUÇÃO GERAL

### 36 37 1. LINGUADO *Paralichthys orbignyanus*

38  
39 Os linguados pertencentes à ordem dos Pleuronectiformes são um grupo  
40 taxonômico amplo, compreendendo 11 famílias e cerca de 500 espécies em todo o mundo,  
41 algumas das quais são de alto interesse comercial tanto na pesca quanto na aquicultura.  
42 A família Paralichthyidae possui pouco mais de cem espécies em 14 gêneros. Estas  
43 espécies assentam-se no substrato sobre seu lado direito, possuindo os dois olhos do lado  
44 esquerdo do corpo. São predadores de fundo, normalmente cobrindo seus corpos quase  
45 totalmente na areia ou lama. São capazes de mudanças rápidas na coloração, que permite  
46 combinar com o ambiente quase perfeitamente (Munroe 2006).

47 O interesse no gênero *Paralichthys* (Girard, 1858) nas últimas décadas foi  
48 impulsionado pelo sucesso do cultivo do hirame (*P. olivaceus*) no Japão, e este gênero  
49 está presente na Lagoa dos Patos (RS, Brasil) e região costeira adjacente, ocorrendo três  
50 espécies das 21 que fazem parte deste gênero: *P. orbignyanus*, *P. patagonicus* e *P.*  
51 *isosceles*. Somente *P. orbignyanus* utiliza o ambiente estuarino e águas costeiras de  
52 profundidade de até 30m, enquanto as demais são encontradas em águas mais profundas  
53 (Figueiredo & Menezes 2000).

54 O linguado *P. orbignyanus* pode atingir mais de 1 m de comprimento e 10 kg de  
55 peso, sendo a espécie de maior porte no sul do Brasil, cujo valor comercial é alto na região.  
56 Encontra-se distribuída desde o litoral do estado do Rio de Janeiro, no Brasil, até Mar del  
57 Plata, na Argentina (Figueiredo & Menezes 2000), sendo considerada estuarino-  
58 dependente por utilizar as regiões estuarinas durante as fases juvenil e subadulto. Esta  
59 espécie é capturada através da pesca industrial e também por pesca artesanal, sendo fácil  
60 obter reprodutores junto à costa. Estes fatores reforçam seu potencial para aquicultura,  
61 incluindo o cultivo em águas estuarinas, podendo tornar-se uma fonte de renda alternativa  
62 na região, especialmente para os pescadores artesanais (Bianchini et al. 2010).

63 Estudos relacionados à biologia e à viabilidade da espécie para aquicultura têm sido  
64 conduzidos nas últimas décadas por pesquisadores da Universidade Federal do Rio  
65 Grande na Estação Marinha de Aquicultura (EMA – FURG). Tais estudos avaliaram,  
66 entre outros fatores, a tolerância a compostos nitrogenados (Bianchini et al. 1996), pH  
67 (Wasiolesky et al. 1997), temperatura (Wasiolesky et al. 1998) e salinidade (Sampaio &  
68 Bianchini 2002; Sampaio et al 2001, 2007). Além disso, protocolos bem definidos para

69 reprodução e larvicultura do linguado em cativeiro já foram estabelecidos e melhorados  
70 (Cerqueira 2005; Rocha et al. 2008; Sampaio et al. 2008; Bianchini et al. 2010). Da  
71 mesma forma que outras espécies de grande importância econômica na aquicultura  
72 mundial, o gênero *Paralichthys*, em geral, possuem algumas dificuldades para a  
73 reprodução espontânea em cativeiro. Assim, como alternativas, realizam-se induções  
74 hormonais da ovulação e fertilizações *in vitro* (Bianchini et al. 2010).

75 As larvas de linguado não apresentam desenvolvimento completo na eclosão,  
76 possuindo um comprimento total de 2 mm, olhos não pigmentados e trato digestório  
77 fechado. Portanto, a sua sobrevivência depende exclusivamente de suas reservas  
78 endógenas. Após o 3º a 4º dia após a eclosão (dae) as larvas apresentam suas reservas  
79 quase extintas e o trato digestório encontra-se aberto, sendo este o momento da primeira  
80 alimentação exógena. A presa oferecida durante a larvicultura é o rotífero *Brachionus*  
81 *plicatilis*, utilizando o sistema de água verde com microalgas *Nannochloropsis oculata*  
82 e *Tetraselmis tetrathele* (Sampaio et al. 2007; Sampaio et al. 2008). A troca do alimento  
83 para náuplios de *Artemia* é realizada quando as larvas atingem entre 5 a 7 mm, sendo uma  
84 substituição gradual para que possam se acostumar com a nova presa. Ao completarem a  
85 metamorfose (10-15 mm), os linguados podem ser alimentados com adultos de *Artemia*,  
86 larvas de peixes, e também alimento inerte, embora ainda seja desconhecido o momento  
87 mais adequado para esta transição alimentar (Bianchini et al. 2010).

88 Ainda que *P. orbignyanus* seja uma espécie com grande potencial para aquicultura,  
89 falta conhecimento sobre alguns aspectos biológicos da espécie, como o sistema  
90 circulatório e a ontogenia do seu sistema imune. Estas informações seriam importantes  
91 para melhorar a sobrevivência e o crescimento nos estágios iniciais do desenvolvimento  
92 do linguado. Uma larva pobremente desenvolvida na eclosão e um estágio relativamente  
93 longo de alimentação com alimento vivo podem tornar as larvas vulneráveis a doenças  
94 bacterianas e virais associadas com altas mortalidades. Um melhor entendimento sobre o  
95 sistema imune é importante para facilitar o estabelecimento de medidas profiláticas  
96 adequadas tais como vacinas e uso de estimulantes.

97

98

99

100

101

## 2. SISTEMA IMUNE

102

103 A imunologia tem sido estudada por mais de duzentos anos, desde a descoberta da  
104 varíola em 1796. Entretanto, a maior parte do que conhecemos hoje sobre a composição,  
105 função e modulação dos sistemas imunes é derivada de estudos em mamíferos (Zhu et al.  
106 2013). A principal função do sistema imune é proteger o organismo contra agentes  
107 estranhos (microorganismos invasores, agentes químicos e outras substâncias exógenas),  
108 ou seja, distinguir entre o que é próprio do organismo e o não próprio. Este sistema é  
109 constituído de uma série de moléculas, células, tecidos e órgãos capazes de realizar estas  
110 funções e gerar a classe certa de resposta imune. Para eliminar agentes não próprios, uma  
111 variedade de mecanismos foi evoluindo, incluindo: a inativação dos agentes biológicos;  
112 lise de células exógenas; fagocitose de material estranho; aglutinação ou precipitação de  
113 moléculas e células (Prabhakar 2010).

114 O sistema imune dos vertebrados é historicamente dividido em celular e humoral,  
115 e em sistema imune inato ou inespecífico e sistema adaptativo ou específico. A primeira  
116 linha de defesa contra organismos invasores é o sistema imune inato, enquanto o sistema  
117 imune adaptativo atua como segunda linha de defesa e também oferece proteção contra  
118 novas exposições ao mesmo patógeno. Cada um possui tanto componentes celulares  
119 quanto humorais pelos quais exercem sua função protetora. Ainda que possuam diferentes  
120 funções, estes componentes não podem existir e agir independentemente. Células do  
121 sistema imune inato interagem com aquelas do sistema imune adaptativo, bem como  
122 células imunes interagem com células não imunes (Prabhakar 2010; Fischer et al. 2013).

123 O sistema imune adaptativo requer algum tempo para reagir contra um organismo  
124 invasor, enquanto o sistema imune inato inclui defesas que, em sua maioria, são  
125 constitutivamente presentes e prontas para serem mobilizadas frente à infecção. O sistema  
126 imune adaptativo é antígeno-específico e reage somente com o agente que induziu a  
127 resposta. Em contraste, o sistema inato não é antígeno-específico e reage da mesma  
128 maneira diante de uma variedade de organismos. Por fim, o sistema imune adaptativo  
129 demonstra memória imunológica, ou seja, “lembra” o encontro com o organismo invasor  
130 e reage mais rapidamente na exposição subsequente ao mesmo organismo,  
131 diferentemente do sistema inato que não apresenta memória imunológica (Prabhakar  
132 2010).

133 Como em todos os vertebrados, os peixes podem sofrer com uma ampla variedade  
134 de doenças e parasitos, utilizando-se de suas defesas inespecíficas e específicas para  
135 protegerem-se, além de possuírem respostas imunes celulares e humorais. Quando  
136 comparado ao sistema imune de vertebrados superiores, o sistema imune dos peixes é

137 eficaz e produz reações inespecíficas semelhantes, como, por exemplo, as reações  
138 granulomatosas (Klosterhoff & Romano, 2012).

139 Peixes e mamíferos possuem muitas semelhanças na função imune (Romano, 2010).  
140 Levando em conta as diferenças de compartimentos do corpo e organização celular, a  
141 maioria dos órgãos linfóides primários e secundários presentes nos mamíferos também  
142 estão nos peixes, exceto pelos linfonodos e a medula óssea. A presença de vasos linfáticos  
143 em peixes ainda é questão de debate (Fischer et al. 2013). As células imunes de peixes  
144 mostram as mesmas características principais que as de outros vertebrados. Os peixes são  
145 os primeiros vertebrados na árvore evolutiva a possuir todas as características primárias  
146 de um sistema imune adaptativo, incluindo a presença de linfócitos, imunoglobulinas (Ig)  
147 produzidas por células B, complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e  
148 receptores de células T (TCR) expressos pelos linfócitos T (Willett et al. 1997).

149 Os peixes estão na base da irradiação dos vertebrados, o chamado “Big Bang” da  
150 resposta imune combinatorial. A persistência dos peixes no ambiente aquático é  
151 certamente relacionada ao sucesso do seu sistema imune (Prabhakar 2010). Além disso,  
152 algumas características de peixes antecipam a sofisticação em mamíferos. Por exemplo,  
153 os centros melanomacrofágicos em peixes antecipam a função dos linfonodos de  
154 mamíferos. A função hematopoiética do rim anterior também é encontrada em alguns  
155 anfíbios. Do ponto de vista evolucionário, a pesquisa sobre sistemas imunes de  
156 vertebrados inferiores se tornará indispensável para um melhor entendimento da história  
157 evolutiva dos sistemas imunes dos vertebrados. Peixes são considerados um modelo  
158 importante em estudos de imunologia comparada por ser uma população representativa  
159 dos vertebrados inferiores servindo como um elo essencial para a evolução inicial dos  
160 vertebrados (Zhu et al. 2013).

161 Uma das principais características do sistema imune de peixes é a sua profunda  
162 relação com a temperatura ambiente. A temperatura limita a imunocompetência, já que,  
163 abaixo de certas temperaturas ou em choque térmico, a produção de Ig e as respostas das  
164 células T são reduzidas. De acordo com Prabhakar (2010), ainda que peixes possuam uma  
165 maior tolerância a baixas temperaturas, uma redução severa da temperatura resultará em  
166 imunossupressão, mesmo para o sistema do complemento e as proteínas da fase aguda.

167

## 168 **2.1. SISTEMA IMUNE INATO OU INESPECÍFICO**

169

170 Geralmente, existem três linhas da defesa imune inata que podem prevenir uma  
171 infecção ou pará-la no começo, antes do sistema imune adaptativo ser ativado. A primeira  
172 delas são as barreiras físicas e químicas que previnem o fácil acesso de micro-organismos  
173 ao interior do corpo (Alberts et al. 2009). Em peixes, essas barreiras incluem a pele e as  
174 escamas, bem como a camada de muco secretada pela epiderme que aprisiona  
175 microrganismos e inibe seu crescimento. Se os patógenos ultrapassam essas defesas, os  
176 peixes podem desenvolver uma resposta inflamatória que aumenta o fluxo sanguíneo para  
177 a região infectada e leva as células brancas que irão tentar destruir os patógenos  
178 (Prabhakar 2010). A flora normal também tem um papel protetor nas superfícies corporais  
179 contra invasores por competir pelo mesmo nicho ecológico, e assim limitar a colonização.

180 A segunda linha de defesa inata compreende as respostas intrínsecas da célula pelas  
181 quais uma célula individual reconhece que está sendo infectada e toma medidas para  
182 danificar ou matar o invasor, entre elas a fagocitose, expondo o organismo invasor a uma  
183 barragem de enzimas digestivas. Por fim, a terceira linha de defesa imune inata depende  
184 de um conjunto de proteínas e células fagocíticas que reconhecem características  
185 conservadas do patógeno e se ativam rapidamente para ajudar a destruir o invasor. Entre  
186 elas estão as células fagocíticas profissionais, como os neutrófilos e macrófagos, as  
187 células natural killer e o sistema do complemento.

188 Entre os macrófagos, nos peixes, existem células que possuem diferentes pigmentos,  
189 ferro, lipofucsina, pigmento ceróide e melanina. Estas células são denominadas  
190 melanomacrófos (MMs) e são um tipo de células apresentadoras de antígenos e  
191 conectam o sistema imune inato ou inespecífico com a resposta imune específica. Os  
192 MMs também são considerados bioindicadores imunológicos do estado de saúde dos  
193 peixes (Macchi et al. 1992).

194 Microorganismos algumas vezes conseguem ultrapassar as barreiras epiteliais.  
195 Depende então dos sistemas imunes inato e adaptativo entrarem em ação para reconhecê-  
196 los e destruí-los sem afetar o hospedeiro. O sistema imune inato é baseado no  
197 reconhecimento de tipos particulares de moléculas que são comuns a muitos patógenos,  
198 mas ausentes no hospedeiro, chamadas de moléculas associadas a patógenos, e que podem  
199 engatilhar dois tipos de resposta imune inata – a resposta inflamatória e a fagocitose por  
200 fagócitos profissionais (neutrófilos e macrófagos) e por células dendríticas, que ativam  
201 as células T do sistema adaptativo. Ambas podem ocorrer rapidamente, mesmo que o  
202 hospedeiro nunca tenha sido previamente exposto a um patógeno em particular (Alberts  
203 et al. 2009).

204 Fatores humorais são produzidos por células para engatilhar, modificar ou suprimir  
205 outras células. Moléculas humorais não específicas em peixes incluem lisozimas,  
206 citocinas, lectinas (reconhecimento de carboidratos), enzimas líticas, transferrinas  
207 (proteínas que se ligam ao ferro) e componentes do sistema do complemento  
208 (Magnadóttir et al. 2005; Fischer et al. 2013).

209 O sistema do complemento em mamíferos consiste de aproximadamente 20  
210 proteínas solúveis interativas, produzidas principalmente pelo fígado, que circulam no  
211 sangue e nos fluidos extracelulares. A maior parte destas proteínas é inativa até o  
212 momento inicial de uma infecção. Elas foram inicialmente identificadas pela capacidade  
213 de amplificar e complementar a ação dos anticorpos, mas alguns dos componentes do  
214 complemento são receptores de reconhecimento de padrões que podem ser ativados  
215 diretamente por imunostimulantes associados aos patógenos (Alberts et al. 2009).

216 Citocinas são moduladoras da resposta imune e tem sido pouco estudadas em peixes.  
217 Um número significativo de citocinas é funcionalmente ativo em teleósteos, mas poucos  
218 dados estão disponíveis se comparados com mamíferos. As citocinas, proteínas secretadas  
219 por células tanto da imunidade inata quanto da adquirida, são agrupadas em três  
220 categorias de acordo com a função exercida: mediadoras e reguladoras da imunidade inata,  
221 mediadoras e reguladoras da imunidade adaptativa e as estimuladoras da hematopoiese.

222 A interleucina-1, a primeira interleucina a ser identificada, possui muitas atividades  
223 biológicas, e tem sido estudada por muitos anos sob vários nomes, tais como mediador  
224 endógeno de leucócitos, hematopoietina 1, pirógeno endógeno, catabolina e fator de  
225 ativação de osteoclastos (Lu et al. 2003). A família de genes IL-1 é composta, entre outros  
226 membros, de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o receptor antagonista a IL-1 (IL-1ra). Estas moléculas  
227 tendem a ser tanto pró-inflamatórias como agir como antagonistas para inibir as  
228 atividades de membros particulares da família, como o IL-1ra que se liga ao receptor IL-  
229 1 para bloquear a ligação tanto da IL-1 $\alpha$  quanto da IL-1 $\beta$  (Secombes et al. 2011). O cDNA  
230 de IL-1 $\beta$  foi primeiramente clonado do rato em 1984 e subsequentemente outros  
231 homólogos em mamíferos foram encontrados (Fujiki et al. 2000). Em peixes, o primeiro  
232 homólogo da IL-1 $\beta$  clonado foi na truta arco-íris (Secombes et al. 1998). Até o momento,  
233 somente dois homólogos da superfamília interleucina-1 foram claramente identificados  
234 em peixes, que são a IL-1 $\beta$  e a IL-18 (Secombes et al. 2011).

235 Em mamíferos, a IL-1 $\beta$  possui um papel fundamental como uma citocina  
236 proinflamatória. É produzida principalmente por monócitos e macrófagos e secretada no

237 sistema circulatório. Sabe-se que a IL-1 $\beta$  aumenta a produção de citocinas e a fagocitose  
238 em macrófagos e é crucial para organismos responderem prontamente a uma infecção,  
239 sendo expressada antes de outras citocinas proinflamatórias e promovendo uma cascata  
240 de reações levando à inflamação (Lu et al. 2003). IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  dividem o mesmo  
241 receptor nas células alvo e exercem funções biológicas semelhantes, ainda que a IL-1 $\beta$   
242 mostre uma função mais potente na resposta imune humoral (Zhu et al. 2013).

243 Em todos os animais, o reconhecimento de invasores microbianos normalmente é  
244 seguido por seu rápido englobamento pelas células fagocíticas. Nos vertebrados, os  
245 macrófagos são fagócitos profissionais que residem em todos os tecidos do corpo e são  
246 especialmente abundantes em áreas que apresentam alto potencial de sofrer infecção,  
247 como os tratos respiratório e intestinal, por exemplo. Também estão presentes em grande  
248 número nos tecidos conectivos, no fígado e no baço. Estas células de longa duração  
249 patrulham os tecidos do organismo e estão entre as primeiras células a estabelecer contato  
250 com os micróbios invasores (Alberts et al. 2009). As células não específicas do sistema  
251 imune de peixes incluem monócitos ou macrófagos nos tecidos, granulócitos (neutrófilos)  
252 e células citotóxicas. A linhagem celular monócito/macrófago é a mais estudada em  
253 peixes, ainda que não haja marcadores celulares específicos disponíveis.

254 Pertencentes à segunda maior família de células fagocíticas nos vertebrados, os  
255 neutrófilos são células de curta duração, abundantes no sangue, mas normalmente  
256 ausentes em tecidos saudáveis normais. Eles são rapidamente recrutados para a região de  
257 infecção tanto por macrófagos ativados quanto por moléculas liberadas pelos patógenos  
258 e por fragmentos de peptídeos de componentes do complemento. Os macrófagos e os  
259 neutrófilos apresentam uma grande diversidade de receptores de superfície celular que  
260 permitem a estas células reconhecer e englobar os patógenos. Uma vez que o patógeno  
261 tenha sido fagocitado, estas células utilizam uma diversidade de “armas” para matá-lo.

262

## 263 **2.2. SISTEMA IMUNE ADAPTATIVO OU ESPECÍFICO**

264

265 Nos vertebrados, a resposta imune inata recruta a resposta adaptativa, e ambas  
266 atuam em conjunto para eliminar os patógenos. A resposta imune adaptativa elimina ou  
267 destrói os patógenos invasores e quaisquer moléculas tóxicas que eles produzem, e usa  
268 múltiplos mecanismos para evitar o dano contra as próprias moléculas. Qualquer  
269 substância capaz de estimular a resposta imune adaptativa é denominada antígeno



270 (gerador de anticorpo). O sistema imune pode distinguir entre antígenos que são muito  
271 semelhantes (Alberts et al. 2009).

272 Ao passo que a aquicultura se expande, problemas de saúde irão inevitavelmente  
273 aparecer tornando o conhecimento sobre o sistema imune vital (Covello et al. 2013). A  
274 presença de um sistema imune adaptativo e conseqüentemente da memória imune permite  
275 a vacinação dos peixes, o que tem sido feito com sucesso para algumas espécies  
276 economicamente importantes (Fischer et al. 2013). Há uma necessidade urgente por  
277 ferramentas para melhorar as respostas imunes celulares à vacinação, que é o método  
278 mais apropriado para o controle de doenças, tanto do ponto de vista econômico como  
279 ético. A disponibilidade dessas ferramentas irá ajudar a desenhar novas vacinas para  
280 induzir mecanismos de resposta imune efetivos.

281 O conhecimento da ontogenia da resposta imune adaptativa é importante para  
282 ajudar a indicar o momento mais apropriado para a vacinação. Entretanto, se os peixes  
283 são vacinados antes de tornarem-se imunologicamente competentes, um fenômeno  
284 conhecido como tolerância imunológica pode ocorrer, levando a uma diminuição da  
285 resposta secundária subseqüente e da eficácia da vacinação (Covello et al. 2013).

286 Peixes ósseos são um dos primeiros grupos a possuir imunoglobulinas (Ig),  
287 receptores de células T (TCR) e recombinação V(D)J, pontos chave para a resposta imune  
288 adaptativa. Uma característica principal do sistema imune adaptativo é a habilidade de  
289 gerar um grande repertório de sítios de ligação a antígenos, tanto na forma de Ig quanto  
290 de TCRs (Covello et al. 2013). O repertório de Ig e TCR é produzido através da reunião  
291 de segmentos gênicos separados durante o desenvolvimento dos linfócitos.

292 Nas imunoglobulinas, cada região V de cadeia leve é codificada por uma seqüência  
293 de DNA que é reunida a partir de dois segmentos gênicos – um segmento gênico V longo  
294 e um pequeno segmento de ligação, ou segmento gênico J. Cada região V de cadeia  
295 pesada das imunoglobulinas é construída de maneira similar por meio da combinação de  
296 segmentos gênicos, mas há um segmento de diversidade adicional, ou segmento gênico  
297 D, que também é necessário. O grande número de segmentos gênicos V, D e J herdados  
298 disponíveis para codificar as cadeias de anticorpos contribui substancialmente para a  
299 diversidade de anticorpos, e a ligação combinatória desses genes (denominada  
300 diversidade combinatória) aumenta bastante esta contribuição. Um arranjo similar de  
301 combinação V(D)J é necessário para a formação de TCR de membrana funcional (Alberts  
302 et al. 2009).

303 No processo de recombinação V(D)J, dois genes associados denominados Rag1 e  
304 Rag2 (genes de ativação da recombinação) codificam proteínas específicas de linfócitos  
305 da recombinase V(D)J, RAG1 e RAG2. Para mediar a união V(D)J, as duas proteínas  
306 associam-se para formar um complexo (denominado RAG), que atua como uma  
307 endonuclease, introduzindo quebras na fita dupla de DNA precisamente entre os  
308 segmentos gênicos a serem unidos e suas sequências-sinal de recombinação. A RAG  
309 então inicia o processo de reunião recrutando as enzimas envolvidas no reparo da fita  
310 dupla de DNA em todas as células (Alberts et al. 2009).

311 Rag1 é altamente regulado, com sua expressão limitada não somente a células  
312 específicas linfóides, mas também a estágios específicos do desenvolvimento dessas  
313 células. Os níveis mais altos de expressão do RAG são observados durante os estágios  
314 iniciais do desenvolvimento de células B e declinam assim que elas amadurecem, com o  
315 nível de mRNA inversamente proporcional ao nível de Ig de superfície, até que o RAG  
316 não seja mais expresso em células B maduras. Uma vez que a expressão do RAG foi  
317 parada, não é re-induzida (Covello et al. 2013). Isso torna o Rag1 um excelente marcador  
318 para acompanhar a maturação do sistema linfóide e a consequente localização das células  
319 envolvidas neste processo (Corripio-Miyar et al. 2007).

320 Existem duas grandes classes de respostas imunes adaptativas – respostas mediadas  
321 por anticorpos e respostas imunes mediadas por células T, ambas presentes nos peixes.  
322 Imunoglobulinas específicas em peixes funcionam na opsonização de bactérias,  
323 neutralização de toxinas ou vírus e são um potente ativador do complemento. Os  
324 patógenos intracelulares são controlados pela imunidade mediada por células. A resposta  
325 mediada por células em peixes é semelhante à de mamíferos e baseia-se na presença de  
326 células acessórias (macrófagos) para apresentar os antígenos às células T (Prabhakar  
327 2010). A correta apresentação do antígeno resulta em uma cascata de eventos que inclui  
328 a produção de citocinas que regula ou aumenta a resposta celular.

329

### 330 **2.2.1. IMUNIDADE ESPECÍFICA HUMORAL**

331

332 A imunidade específica humoral é mediada por anticorpos (Ig), proteínas secretadas  
333 pelas células B, que circulam na corrente sanguínea e permeiam os outros fluidos  
334 corporais, onde se ligam especificamente ao antígeno que estimulou sua produção. A  
335 ligação do anticorpo ao antígeno inativa vírus e toxinas microbianas, bloqueando sua  
336 capacidade de se ligar a receptores na célula do hospedeiro, e também marca os patógenos

337 invasores para serem destruídos, principalmente facilitando o processo de fagocitose  
338 pelas células do sistema imune inato (Alberts et al. 2009). Todos os vertebrados possuem  
339 múltiplos isotipos de Ig e a IgM é a única Ig que está presente em todos os vertebrados  
340 (Swain & Nayak 2009). A única imunoglobulina que os peixes possuem é a IgM,  
341 caracterizada por ser um tetrâmero ou quatro monômeros de duas cadeias pesadas e duas  
342 leves, enquanto nos mamíferos e humanos a IgM é um pentâmero ou cinco monômeros.

343

### 344 **2.2.2. IMUNIDADE ESPECÍFICA CELULAR**

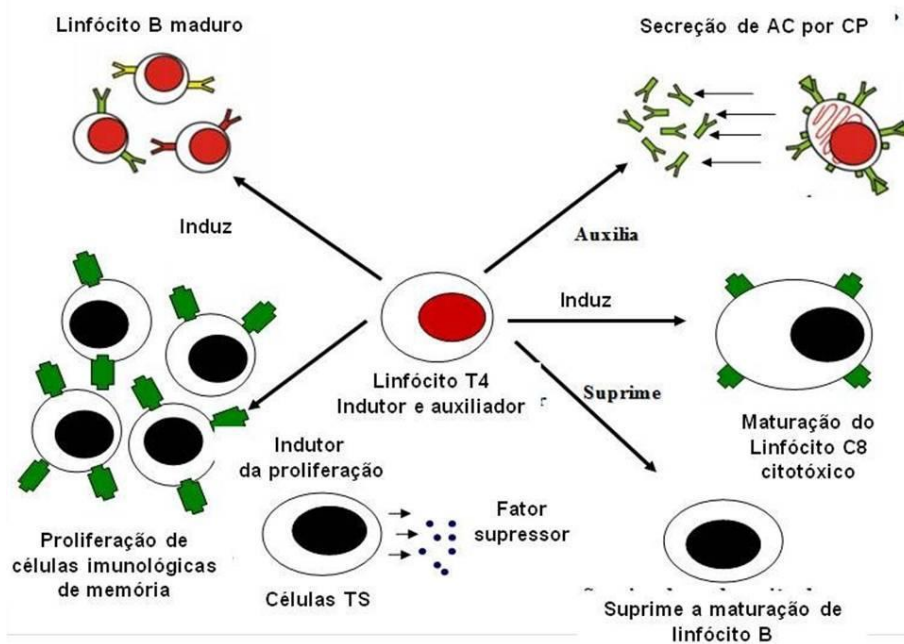
345

346 Os linfócitos são responsáveis pela extraordinária especificidade das respostas  
347 imunes adaptativas. Eles estão presentes em grande número na corrente sanguínea e na  
348 linfa, e também concentrados nos órgãos linfóides. Entretanto, respondem a antígenos  
349 estranhos somente quando o sistema imune inato é ativado anteriormente. A resposta  
350 imune celular, ou mediada por células T, é a segunda classe de respostas imunes  
351 adaptativas, na qual ativa células T a reagirem diretamente contra antígenos estranhos que  
352 são apresentados a elas na superfície de uma célula hospedeira, a célula apresentadora de  
353 antígeno. A célula T pode matar uma célula hospedeira infectada por vírus que apresente  
354 antígenos virais em sua superfície ou produzir moléculas sinalizadoras que tanto ativam  
355 macrófagos a destruir os micróbios invasores que fagocitaram quanto auxiliam na  
356 ativação das células B para produzirem anticorpos contra os micróbios (Alberts et al.  
357 2009) (Figura 1).

358 As respostas mediadas pelas células T diferem das respostas mediadas pelas células  
359 B em pelo menos duas maneiras essenciais. Primeiro, as células T são ativadas por  
360 antígenos estranhos a proliferarem e diferenciarem-se em células efetoras somente  
361 quando os antígenos encontram-se na superfície de células apresentadoras de antígenos,  
362 as quais processaram o antígeno e somente apresentam aos linfócitos T4 o epítipo ou  
363 determinante antigênico. As células T necessitam dessas células para ativação porque a  
364 forma do antígeno que elas reconhecem é diferente daquela reconhecida pelas células B,  
365 que reconhecem antígenos intactos. As células T, no entanto, reconhecem fragmentos de  
366 antígenos protéicos que tenham sido parcialmente degradados dentro de uma célula  
367 apresentadora de antígeno. Os fragmentos do peptídeo são então transportados para a  
368 superfície da APC e associados a moléculas especiais denominadas proteínas do MHC.  
369 A segunda diferença é que, quando ativada, a célula T efetora atua apenas localmente,  
370 tanto dentro dos órgãos linfóides secundários, quanto após terem migrado para o local de

371 infecção. As células B, ao contrário, secretam anticorpos que podem agir em regiões  
372 distantes. Ainda assim, a maioria das respostas imunes adaptativas, incluindo as resposta  
373 mediadas por anticorpos, necessita das células T auxiliares para sua ativação (Alberts et  
374 al. 2009; Romano 2010).

375  
376



377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384  
385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392

Figura 1. Funções do linfócito T4 na resposta imune de vertebrados (Romano, 2010).

393 Cada linfócito desenvolve-se em um órgão linfóide central e se torna comprometido  
394 a reagir com um determinado antígeno antes mesmo de ser exposto a ele. A expressão  
395 desse comprometimento ocorre na forma de receptores que se ligam especificamente ao  
396 antígeno, os receptores de células T (TCRs). Quando um linfócito encontra seu antígeno  
397 específico em um órgão linfóide periférico, a ligação do antígeno ao receptor ativa o  
398 linfócito induzindo-o a proliferar, e produzindo mais células para o mesmo receptor,  
399 processo denominado expansão clonal. A resposta imune primária ocorre quando um  
400 animal tem o primeiro contato com o antígeno, aumentando rápida e exponencialmente e,  
401 após, diminuindo gradualmente. Se o mesmo animal for apresentado novamente a esse  
402 antígeno, mesmo depois de anos, ele geralmente produzirá uma resposta imune  
403 secundária, cujo intervalo de tempo é menor que a anterior, e a resposta é mais intensa e  
404 mais eficiente. A resposta secundária, portanto, reflete a memória imunológica antígeno-  
405 específica (Alberts et al. 2009).

406 As células B e T podem ser distinguidas morfológicamente uma da outra somente  
407 após terem sido ativadas pelo antígeno. Após a ativação pelo antígeno, proliferam e  
408 maturam em células efectoras. As células B efectoras secretam anticorpos e, na sua forma  
409 mais diferenciada, são chamadas de células plasmáticas e ativamente produzem  
410 anticorpos. As células T efectoras não secretam anticorpos, e sim uma variedade de  
411 proteínas sinalizadoras denominadas citocinas.

412 A proliferação contínua de células B e T requer interações com células do estroma  
413 dos órgãos nos quais amadurecem. As células T, por exemplo, precisam adquirir a  
414 habilidade de distinguir o próprio do não próprio, processo chamado “educação” e que  
415 requer interações entre as células T em amadurecimento e as células não linfóides do  
416 estroma do timo. Os genes que direcionam esse processo são desconhecidos (Swain and  
417 Nayak 2009). Existem três classes principais de células T: as células T citotóxicas, as  
418 células T auxiliares e as células T reguladoras (supressoras). As células T citotóxicas  
419 matam as células infectadas. As células T auxiliares ativam os macrófagos, as células  
420 dendríticas, as células B e as células T citotóxicas através das citocinas e da apresentação  
421 de proteínas coestimuladoras em sua superfície. As células T reguladoras inibem a função  
422 das células T auxiliares, das células T citotóxicas e das células dendríticas (Alberts et al.  
423 2009).

424 As moléculas mais importantes no reconhecimento de células apresentadoras de  
425 antígenos infectadas são CD3, TCR, CD4 e CD8 (nas células T) e MHC classe I e II (nas  
426 células apresentadoras de antígenos). CD3 e TCR juntas formam o complexo receptor da

427 célula T pelo qual as células T reconhecem os peptídeos associados ao MHC que são  
428 expressos sobre células alvo infectadas. O CD3 é indispensável para a expressão dos  
429 genes TCR. MHCs são altamente polimórficos entre indivíduos da mesma espécie e assim  
430 as células apresentadoras de antígenos são apenas reconhecidas pelas células T se tanto o  
431 MHC quanto o peptídeo se encaixarem em um dado TCR. Assim, o reconhecimento das  
432 células infectadas pelas células T é altamente específico e somente algumas espécies de  
433 TCR reconhecem certos peptídeos necessitando de TCRs altamente diversificados. Esta  
434 diversificação, como nas imunoglobulinas, é baseada no gene de rearranjo V(D)J (Fischer  
435 et al. 2013).

436 Em mamíferos e aves, células T citotóxicas e células T auxiliares são os principais  
437 tipos de células T que carregam CD8 e CD4, respectivamente. CD8 e CD4 são ambos  
438 correceptores em linfócitos T, estabilizando os complexos TCR/antígeno-MHC. CD4 é  
439 associado com o TCR das células T auxiliares durante a interação com células  
440 apresentando peptídeos de origem extracelular (p. ex. bactérias) através de MHC classe  
441 II, enquanto o CD8 é um correceptor de células T citotóxicas que interagem com MHC  
442 classe I durante a apresentação dos peptídeos antigênicos de origem intracelular (p. ex.,  
443 vírus). Enquanto o MHC classe II é somente expresso pelas células apresentadoras de  
444 antígeno profissionais como as células B, células dendríticas e macrófagos, MHC classe  
445 I é expresso por todas as células nucleadas, o que inclui eritrócitos e trombócitos em  
446 peixes. Todas as células T carregam o complexo CD3 junto com o TCR, e a identificação  
447 do CD3 provou ser um método confiável para identificar células T em várias espécies  
448 (Øvergård et al. 2009; Fischer et al. 2013). Devido à falta de marcadores para linfócitos  
449 T em peixes, as caracterizações das populações de células T e suas funcionalidades ainda  
450 precisam ser definidas em teleósteos (Toda et al. 2011).

451 A expressão de CD4 e CD8 é crítica para a defesa imune mediada por células e o  
452 desenvolvimento de células T no timo. O processo de seleção induz apoptose em  
453 timócitos que não interagem com moléculas próprias do MHC (seleção positiva), e  
454 aqueles que possuem receptores de alta afinidade para MHC próprio e MHC próprio que  
455 apresenta peptídeos próprios (seleção negativa). Células unicamente positivas são geradas  
456 pelo comprometimento de linhagem, um processo em que ou o CD4 ou o CD8 são infra-  
457 regulados (Øvergård et al. 2011). A proteína CD4 é composta de quatro domínios  
458 extracelulares semelhantes a imunoglobulinas, uma região transmembrana e uma cauda  
459 citoplasmática que se associa com uma proteína tirosina quinase, p56, envolvida na  
460 ativação da célula T (Sun et al. 2007).

461 O primeiro CD4 homólogo em animal ectotérmico foi identificado no fugu  
462 (*Takifugu rubripes*) e foi designado como CD4L-1. Até o momento, em teleósteos, dois  
463 tipos de CD4 foram encontrados: uma versão longa (CD4L-1 – quatro domínios Ig) e uma  
464 versão curta (CD4L-2 – dois ou três domínios Ig) (Sun et al. 2007). Comparado com o  
465 CD4L-1, o padrão de expressão do CD4L-2 se encaixa melhor com a identidade CD4.  
466 Aparentemente, diferentes espécies de peixes possuem apenas duas das três formas  
467 divergentes de CD4, a clássica e ou a forma de três domínios ou a forma de dois domínios  
468 (Øvergård et al. 2010). É de grande interesse saber as diferenças funcionais entre as duas  
469 células CD4L positivas e seu envolvimento no desenvolvimentno da célula T e imunidade  
470 mediada por células, já que somente teleósteos possuem dois CD4s (Toda et al. 2011).

471 A determinação das populações de linfócitos T com receptores CD3 e  
472 especialmente CD4 são críticas para que a vacina seja eficiente. Estes receptores podem  
473 ser avaliados com imunohistoquímica. Os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4  
474 de humanos podem ser utilizados para avaliar a expressão destes receptores já que  
475 possuem reação cruzada em situações de normalidade (Romano et al., 2004), ou em  
476 modificações que alteram o funcionamento do sistema imune (Romano, 2008; Batista et  
477 al. 2014).

478

### 479 **2.3. ÓRGÃOS LINFÓIDES**

480

481 Os principais órgãos imunes dos teleósteos incluem o rim anterior, timo e baço,  
482 além de áreas imunes espalhadas pelas mucosas (pele, brânquias, intestino e gônadas).  
483 Entretanto, não há tecidos linfóides associados a mucosas organizados como em  
484 mamíferos. Teleósteos também não possuem linfonodos, e o baço, juntamente com o rim,  
485 formam os dois órgãos filtradores principais (Genten et al. 2009; Fischer et al. 2013).

486 O baço é normalmente um órgão solitário, vermelho escuro na cavidade peritoneal  
487 adjacente à parede do intestino. Os mesmos elementos básicos em vertebrados superiores  
488 estão tipicamente presentes: vasos sanguíneos, polpas branca e vermelha, e elipsóides. O  
489 baço é coberto por uma fina cápsula fibrosa com pouca evidência de habilidade contrátil.  
490 A polpa vermelha é um sistema extensivo interconectado de cordões esplênicos e  
491 capilares sinusóides, consistindo basicamente de células eritróides e trombócitos, e  
492 normalmente compreende a maior parte do parênquima esplênico. A polpa branca,  
493 consistindo principalmente de células linfóides, tipicamente circunda vasos arteriais,

494 centros melanomacrófagos e elipsóides, ou formam pequenos pacotes no parênquima  
495 (Genten et al. 2009).

496 O melanomacrófago é um fagócito contendo quantidades variáveis de pigmento,  
497 incluindo melanina, hemosiderina, ceróide ou lipofucsina, localizado nos vacúolos. Os  
498 melanomacrófagos e centros melanomacrófagos também são encontrados no rim e no  
499 fígado. A filtração do sangue e a destruição eritrocitária é realizada pelos centros  
500 melanomacrófagos, formados pela acumulação de macrófagos associados aos capilares  
501 elipsóides. Estes centros podem reter antígenos como complexos imunes por longos  
502 períodos (Prabhakar 2010). Peixes cronicamente estressados, incluindo aqueles que não  
503 estão saudáveis, tendem a possuir mais e mais largos centros melanomacrófagos. O  
504 tamanho e número dos centros melanomacrófagos também aumenta com a idade do  
505 peixe (Genten et al. 2009).

506 O rim anterior ou cefálico contém uma variedade de tecidos que não possuem  
507 função no sistema urinário, sendo exclusivamente hemopoético. Os blastócitos estão  
508 situados dentro de um estroma do tecido (fibras e células endoteliais) semelhantemente  
509 ao da medula óssea de mamíferos. As células endoteliais alinham-se com numerosos  
510 capilares descontínuos, através dos quais o sangue da veia porta renal passa por filtração  
511 (Genten et al. 2009). Em peixes, o rim anterior também é um importante órgão endócrino,  
512 homólogo às glândulas adrenais de mamíferos, liberando corticosteróides e outros  
513 hormônios. Também é um órgão bastante innervado, possuindo funções reguladoras chave,  
514 além de ser um órgão central para interações imunoendócrinas e conexões  
515 neuroimunoendócrina. (Prabhakar 2010).

516 O timo de peixes é um órgão linfóide pareado situado na região dorsal de cada  
517 cavidade branquial. É normalmente coberto por uma fina cápsula. Células epiteliais  
518 formam, no parênquima tímico, uma rede tridimensional que suporta os timócitos. O timo  
519 funciona como um sítio de diferenciação de linfócitos (timócitos) envolvidos na  
520 imunidade mediada por células, antes da sua migração para tecidos linfóides periféricos  
521 (Genten et al. 2009). O timo é definido como um órgão linfóide primário devido ao seu  
522 papel inimitável no desenvolvimento das células T. A involução do timo em peixes  
523 depende mais de ciclos hormonais e variações sazonais do que da idade (Prabhakar 2010).  
524 Em peixes sexualmente maduros, o tecido do timo é bastante mudado, sem sinais de  
525 medula. A região cortical restante parece conter somente células maduras e corpúsculos  
526 de Hassal (Fischer et al. 2013).



527 O timo em mamíferos provê microambientes especializados que suportam e  
528 direcionam a diferenciação e seleção das células T. Os linfócitos em desenvolvimento no  
529 córtex e medula tímicos são engajados nas interações extensivas com ligantes de  
530 peptídeos próprios apresentados pelo MHC expresso na rede tridimensional. Assim, o  
531 timo pode ser visto como um filtro eficiente, através do qual as células T em  
532 desenvolvimento positivamente selecionadas passam assim que amadurecem. Em  
533 teleósteos ainda não há informação precisa disponível sobre a diferenciação e seleção das  
534 células T, passos cruciais para estabelecer um sistema imune funcional. Todas as espécies  
535 de vertebrados gnatostomados possuem glândulas tímicas que podem variar em posição  
536 anatômica, mas conservam uma histologia muito semelhante que reflete a importância da  
537 função (Picchiatti et al. 2009).

538

#### 539 **2.4. ONTOGENIA DO SISTEMA IMUNE**

540

541 Nas duas décadas passadas, o aumento massivo da aquicultura colocou uma grande  
542 ênfase em estudos do sistema imune e mecanismos de defesa contra doenças associadas  
543 com peixes. Mortalidades significativas são rotineiramente registradas em estágios larvais  
544 e pós-larvais de peixes ao longo do mundo, e há uma grande necessidade de melhora da  
545 taxa de sobrevivência de larvas de peixes. Além disso, as larvas de peixes possuem  
546 nenhuma ou limitada habilidade de resposta imune antes da maturação do sistema imune,  
547 assim a imunização direta pode não melhorar a imunidade (Zhang et al. 2013). Entretanto,  
548 a imunogênese permanece incompletamente caracterizada principalmente porque não há  
549 consenso nos índices histológicos e funcionais para definir os estádios de  
550 desenvolvimento larval em relação à maturação dos órgãos linfóides.

551 A ontogenia dos órgãos imunes em teleósteos tem sido amplamente estudada em  
552 diferentes espécies, e a maioria desses estudos morfológicos tem sido realizados  
553 utilizando a histologia como técnica principal para investigar o desenvolvimento dos  
554 órgãos imunes em peixes (Corripio-Miyar et al. 2007). Entretanto, genes imunes são  
555 também bons marcadores no estudo da maturidade fisiológica do sistema imune e  
556 potencialmente dão uma medida mais precisa do desenvolvimento inicial da  
557 imunocompetência como, por exemplo, o aparecimento dos linfócitos num órgão linfóide  
558 (Swain & Nayak 2009).

559 A ontogênese dos órgãos linfomiélóides começa poucas horas após a fertilização,  
560 mas a sequência de desenvolvimento pode diferir entre as espécies. Geralmente, o timo é

561 o primeiro órgão a tornar-se linfóide, seguido pelo rim e pelo baço. Ainda que os órgãos  
562 linfóides e os linfócitos B e T apareçam cedo durante a embriogênese, a aquisição de  
563 imunocompetência leva de poucas a muitas semanas dependendo da espécie de peixe  
564 (Swain & Nayak 2009). Ovos de peixes são dependentes da provisão materna de  
565 moléculas imunorrelevantes para a proteção contra patógenos invasores antes da  
566 maturação total de sistemas imunológicos. O desenvolvimento dos órgãos imunes em  
567 peixes marinhos depende de uma variedade de fatores incluindo temperatura da água,  
568 tamanho dos ovos e duração do período do saco vitelínico. Inúmeras espécies de peixes  
569 marinhos, como o linguado *P. orbignyanus*, eclodem em um estágio precoce do  
570 desenvolvimento, ainda com o saco vitelínico.

571

### 572 **3. SISTEMA CIRCULATORIO**

573

#### 574 **3.1. SANGUE**

575

576 O sangue de peixes é semelhante ao de qualquer outro vertebrado. Consiste de  
577 plasma e componentes celulares. Os componentes celulares são os eritrócitos (células  
578 vermelhas), leucócitos (células brancas) e trombócitos. O plasma é a porção líquida que  
579 funciona como um solvente para uma variedade de solutos incluindo proteínas, gases  
580 dissolvidos, eletrólitos, nutrientes, material descartado e substâncias regulatórias. A linfa  
581 é a parte do plasma que sai pelos capilares para banhar os tecidos (Genten et al 2009;  
582 Prabhakar 2010).

583

##### 584 **3.1.1. CÉLULAS SANGUÍNEAS**

585

586 Em peixes, os eritrócitos são ovais e nucleados e o citoplasma é saturado com  
587 hemoglobina. Os eritrócitos estão presentes no sangue de peixes em um número variável  
588 de acordo com a espécie e com a idade do indivíduo, estação e condições ambientais. O  
589 tamanho dos eritrócitos é maior em elasmobrânquios do que em teleósteos, ligeiramente  
590 menor em espécies ativas que em espécies não ativas, e maior em teleósteos de altas  
591 profundidades (Prabhakar 2010).

592 Os leucócitos presentes no sangue periférico de peixes podem ser de dois tipos:  
593 granulócitos ou agranulócitos. A nomenclatura é baseada na afinidade de colorações  
594 ácidas e básicas e depende da hematologia humana (Prabhakar 2010). A classificação dos

595 leucócitos em peixes está repleta de problemas não resolvidos, em parte porque os  
596 métodos usados na hematologia de mamíferos por vezes não dá bons resultados quando  
597 aplicados a esfregaços de sangue de peixes (Genten et al. 2009).

598 Agranulócitos não possuem grânulos no citoplasma e possuem o núcleo não lobado,  
599 podendo ser de dois tipos: linfócitos e monócitos. Os linfócitos são o tipo mais numeroso  
600 de leucócitos, constituindo de 70 a 90% do total de leucócitos. A função principal dos  
601 linfócitos é produzir mecanismos para a geração da resposta imune e a produção de  
602 anticorpos. Os monócitos constituem uma proporção muito menor de leucócitos, e por  
603 vezes estão ausentes em algumas espécies de peixes. Os monócitos possuem função  
604 fagocítica e sugere-se que sejam originados no rim e tornem-se aparentes no sangue  
605 apenas quando substâncias estranhas estejam presentes nos tecidos ou na corrente  
606 sanguínea.

607 Granulócitos possuem grânulos no citoplasma em grande quantidade e núcleo  
608 multilobado. Podem ser de três tipos: neutrófilos, eosinófilos e basófilos, sendo os  
609 neutrófilos são os mais numerosos. O número de neutrófilos circulantes observados em  
610 peixes varia consideravelmente (1-25% dos leucócitos). Os eosinófilos não foram  
611 observados em algumas espécies de peixes, mas tipicamente estas células tem sido  
612 identificadas pela presença de grandes grânulos citoplasmáticos avermelhados (eosina).  
613 Assim como os eosinófilos, a ocorrência de basófilos no sangue de peixes pode variar.  
614 Quando presentes possuem um núcleo grande e excêntrico com grandes inclusões  
615 citoplasmáticas roxo-azuladas.

616 Os trombócitos são células redondas, ovais ou fusiformes, com citoplasma granular,  
617 que auxiliam na coagulação sanguínea. Já foi reportado que os trombócitos de peixes são  
618 macrófagos sanguíneos que formam uma das barreiras protetoras contra agentes estranhos  
619 e podem ser consideradas células verdadeiramente digestivas, porque podem remover  
620 fragmentos celulares da circulação diretamente por fagocitose (Genten et al. 2009).

621

622

### 623 **3.1.2. HEMATOPOIESE**

624

625 A formação de células e fluidos do sangue é conhecida como hematopoiese. Tanto  
626 os eritrócitos quanto os leucócitos são originados de hemoblastos linfóides ou  
627 hemocitoblastos e normalmente amadurecem depois que entram na corrente sanguínea.  
628 Em peixes, além do baço, os eritrócitos e granulócitos são produzidos no rim (pronefros).

629 A partir de células tronco comuns, três linhagens de células sanguíneas diferentes são  
630 geradas: eritróide, mielóide e linfóide. A linhagem mielóide inclui os monócitos  
631 (macrófagos) e os granulócitos, a eritróide inclui os eritrócitos e trombócitos, e a linfóide  
632 inclui os linfócitos B e T.

633

634

635 Considerando-se o que foi abordado, esta tese foi desenvolvida de modo a avaliar  
636 o desenvolvimento do sistema imune do linguado *P. orbignyana* sob as perspectivas  
637 histológica e molecular, além das características morfológicas das células sanguíneas  
638 desta espécie, de modo a ampliar o conhecimento biológico que vem sendo obtido e  
639 melhorar o pacote tecnológico para o cultivo do linguado, reduzindo as taxas de  
640 mortalidade no início do desenvolvimento e possibilitando melhora no crescimento e  
641 engorda. Este trabalho também visa oferecer conhecimento básico sobre a maturação do  
642 sistema imune para que seja possível desenvolver e utilizar ferramentas que diminuam a  
643 susceptibilidade dos animais a patógenos e doenças, como vacinas e imunoestimulantes,  
644 além de facilitar o diagnóstico de condições patológicas através do conhecimento da  
645 histologia normal dos órgãos relacionados ao sistema imune e do perfil sanguíneo da  
646 espécie.

647

648

649           **OBJETIVOS**

650

651           **OBJETIVO GERAL**

652           Este trabalho teve como objetivo estudar características do sistema imune do  
653   linguado *Paralichthys orbignyanus* através de histologia e análise da expressão gênica e  
654   avaliar a formação do sistema imune inato e adaptativo, bem como as características  
655   morfológicas do sangue de adultos, obtendo informações relevantes para melhorar o  
656   cultivo desta espécie em cativeiro.

657

658           **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

659           - Descrever o desenvolvimento dos órgãos linfóides em larvas e juvenis do linguado  
660   através de histologia;

661           - Isolar, identificar e quantificar a expressão de genes relacionados ao  
662   desenvolvimento sistema imune de larvas e juvenis do linguado;

663           - Analisar as características morfológicas do sangue de adultos do linguado.

664

665

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 666  
667
- 668 ALBERTS, B, A JOHNSON, J LEWIS, M RAFF, K ROBERTHS & P WALTER. 2009.  
669 Biologia molecular da célula. 5ª edição. Ed. Artmed. 1268 p.
- 670 BATISTA, CR, MA FIGUEIREDO, DV ALMEIDA, LA ROMANO & LF MARINS.  
671 2014. Impairment of the Immune System in Gh-Overexpressing Transgenic  
672 Zebrafish (*Danio rerio*). Fish Shellfish Immunol., 36: 519-524.
- 673 BIANCHINI, A, W WASIELESKY JR & KC MIRANDA-FILHO. 1996. Toxicity of  
674 nitrogenous compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. of  
675 Environ. Contam. Toxicol., 56: 453-459.
- 676 BIANCHINI, A, RB ROBALDO & LA SAMPAIO. 2010. Cultivo do linguado  
677 (*Paralichthys orbignyanus*). In: BALDISSEROTTO, B & LC GOMES. (eds.).  
678 Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Santa Maria: UFSM.
- 679 CERQUEIRA, VR. 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes,  
680 1839). Braz. Arch. Biol. Technol., 48(3): 459-465.
- 681 CORRIPIO-MIYAR, Y, S BIRD, JW TREASURER & CJ SECOMBES. 2007. RAG-1  
682 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid  
683 haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. Fish Shellfish Immunol., 23: 71-85.
- 684 COVELLO, JM, S BIRD, RN MORRISON, AR BRIDLE, SC BATTAGLENE, CJ  
685 SECOMBES & BF NOWAK. 2013. Isolation of RAG-1 and IgM transcripts from  
686 the striped trumpeter (*Latris lineata*), and their expression as markers for  
687 developmental of the adaptive immune response. Fish Shellfish Immunol., 34: 778-  
688 788.
- 689 FIGUEIREDO, JL & NA MENEZES. 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do  
690 Brasil. Volume VI. São Paulo: Museu de Zoologia: Universidade de São Paulo.  
691 116p.
- 692 FISCHER, U, EO KOPPANG & T NAKANISHI. 2013. Teleost T and NK cell immunity.  
693 Fish Shellfish Immunol., 35: 197-206.
- 694 FUJIKI, K, D-H SHIN, M NAKAO & T YANO. 2000. Molecular cloning and expression  
695 analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 $\beta$ , high affinity immunoglobulin E  
696 Fc receptor  $\gamma$  subunit and serum amyloid A. Fish Shellfish Immunol., 10: 229-242.
- 697 GENTEN, F, E TERWINGHE & A DANGUY. 2009. Atlas of fish histology. USA:  
698 Science Publishers. 215p.

- 699 KLOSTERHOFF, MC & LA ROMANO. 2012. Pulse granulomas detected in  
700 peritoneum of a wild rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* with acanthocephalan  
701 infections. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 32(2): 63-67.
- 702 LU, X-J, J CHEN, Y-Q HE & Y-H SHI. 2013. Molecular characterization of an IL-1 $\beta$   
703 gene from ayu, *Plecoglossus altivelus*. Fish Shellfish Immunol., 34: 1253-1259.
- 704 MACCHI, JG, LA ROMANO & HE CHRISTIANSEN. 1992. Melano-Macrophage  
705 Centres as Biological Indicators of Environmental Change in Whitemouth Croaker,  
706 *Micropogonias furnieri*. J. Fish. Biol., 40: 971-973
- 707 MAGNADÓTTIR, B, S LANGE, S GUDMUNSDOTTIR, J BOGWALD & RA  
708 DALMO. 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. Fish Shellfish  
709 Immunol., 19: 429-439.
- 710 MUNROE, TA. 2006. Family Paralicthyidae. The Living Marine Resources of the  
711 Eastern Central Atlantic. FAO Species Identification Guide for Fishery  
712 Purposes. Carpenter, K.E. Rome, FAO.
- 713 ØVERGÅRD, A-C, IU FIKSDAL, AH NERLAND & S PATEL. 2011. Expression of T-  
714 cell markers during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ontogenesis.  
715 Dev. Comp. Immunol., 35: 203-213.
- 716 PRABHAKAR, A. 2010. Fish immunology and biotechnology. India: Swastik  
717 Publications. 321 p.
- 718 PICCHIETTI, S, L GUERRA, F BUONOCORE, E RANDELLI, AM FAUSTO & L  
719 ABELLI. 2009. Lymphocyte differentiation in sea bass thymus: CD4 and CD8-a  
720 gene expression studies. Fish Shellfish Immunol., 27(1):50-56.
- 721 ROCHA, AF, CVA CARVALHO & LA SAMPAIO. 2008. Produção de juvenis do  
722 linguado *Paralichthys orbignyanus*: efeito da duração do período de co-alimentação  
723 durante o desmame. Ciênc. Rural, 38(8): 2334-2338.
- 724 ROMANO, LA. 2008. La inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica de  
725 enfermedades de los peces. Anales Soc. Cient. Argent., 417: 379-386.
- 726 ROMANO, LA. 2010. El sistema Inespecífico de los Peces. In: SILVA-SOUZA,  
727 AT, MAP LIZAMA & RM TAKEMOTO (eds.) Patología e Sanidade de  
728 organismos Acuáticos. ABRAPOA.
- 729 ROMANO LA, V MAROZZI & C ZENOBI. 2004. Utilización de anticuerpos humanos  
730 en la marcación de receptores CD3 y CD4 de linfocitos en *Xiphophorus hellerii*.  
731 Rev. Soc. Cient. Argent., 43:123-127.

732 SAMPAIO, LA, A BIANCHINI & VR CERQUEIRA. 2001. Growth of juvenile  
733 Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. J.  
734 Appl. Aquac., 11: 67-75.

735 SAMPAIO, LA & A BIANCHINI. 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth  
736 of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 269:  
737 187-196.

738 SAMPAIO, LA, LS FREITAS, MH OKAMOTO, LR LOUZADA, RV RODRIGUES &  
739 RB ROBALDO. 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys*  
740 *orbignyanus* from fertilization to juvenile settlement. Aquac., 262: 340-346.

741 SAMPAIO, LA, RB ROBALDO & A BIANCHINI. 2008. Hormone-induced ovulation,  
742 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*  
743 (Valenciennes, 1839). Aquac. Res., 39: 712-717.

744 SECOMBES, CJ, J ZOU, DG DANIELS, C CUNNINGHAM, A KOUSSOUNADIS &  
745 G KEMP. 1998. Rainbow trout cytokine and cytokine genes. Immunol. Rev., 166:  
746 333-340.

747 SECOMBES, CJ, T WANG & S BIRD. 2011. The interleukins of fish. Dev. Comp.  
748 Immunol., 35: 1336-1345.

749 SUN, X-F, N SHANG, W HU, Y-P WANG & Q-L GUO. 2007. Molecular  
750 characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8 $\beta$  and CD4-like genes. Fish  
751 Shellfish Immunol., 23: 1242-1255.

752 SWAIN, P & SK NAYAK. 2009. Role of maternally derived immunity in fish. Fish  
753 Shellfish Immunol., 27:89-99.

754 TODA, H, Y SAITO, T KOIKE, F TAKIZAWA, K ARAKI, T YABU, T SOMAMOTO,  
755 H SUETAKE, Y SUZUKI, M OTOTAKE, T MORITOMO & T NAKANISHI.  
756 2011. Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes  
757 in a teleost fish. Dev. Comp. Immunol., 35: 650-660.

758 WASIELESKY JR, W, A BIANCHINI, MH SANTOS & LH POERSCH. 1997.  
759 Tolerance of juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. J. World  
760 Aquac. Soc., 28: 202-204.

761 WASIELESKY JR, W, KC MIRANDA-FILHO & A BIANCHINI. 1998. Tolerancia a la  
762 temperatura de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. Frente Marít., 17:  
763 43-48.

764 WILLETT, CE, AG ZAPATA, N HOPKINS & STEINER. 1997. Expression of zebrafish  
765 rag genes during early development identifies the thymus. Dev. Biol., 182: 331-341.



766 ZHANG, S, Z WANG & H WANG. 2013. Maternal immunity in fish. *Dev. Comp.*  
767 *Immunol.*, 39:72-78.  
768 ZHU, L, L NIE, G ZHU, L XIANG & J-Z SHAO. 2013. Advances in research of fish  
769 immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity  
770 in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.*, 39: 39-62.  
771

**CAPÍTULO 1**

772

773

774

775

776

777

778

779

780

781

782

783

784 **Development of the Lymphoid Organs of Larvae and Juvenile of the Brazilian**  
785 **Flounder Paralichthys orbignyanus (Teleostei: Paralichthyidae)**

786

787 Emeline P. Gusmão, Martin Bessonart, Luis A. Romano, Luís A. Sampaio

788

789

790

791

792 Artigo submetido a Journal of the World Aquaculture Society

793

794

795       **Development of the Lymphoid Organs of Larvae and Juvenile of the Brazilian**  
796               **Flounder Paralichthys orbignyanus (Teleostei: Paralichthyidae)**

797  
798                               **Abstract**

799  
800       The Brazilian flounder Paralichthys orbignyanus (Valenciennes, 1839) has a great  
801 commercial value and potential for aquaculture activities in southern Brazil. Protocols  
802 for reproduction and larviculture in captivity have already been well defined for this  
803 species, though the larval rearing is still marked by high and variable mortality rates.  
804 This paper examines the development of lymphoid organs in larvae and juveniles of P.  
805 orbignyanus in order to improve the technological package that is being developed for  
806 the species. Larvae provenient from artificial fertilization of wild broodstock were  
807 obtained in laboratory and the hatchery was held wick constant aeration, illumination  
808 and temperature of 24 C. Larvae and juvenile were fed with rotifers and Artemia, which  
809 were gradually replaced by dry feed. Samples of larvae and juvenile from 0 to 50 days  
810 after hatching (dah) were fixed in Bouin's liquid, parafin embedded, sectioned and  
811 stained with hematoxylin-eosin. The analysis under light microscopy showed that the  
812 lymphoid organs of P. orbignyanus appeared in the following sequence: kidney (1 dah),  
813 thymus (5 dah) and spleen (10 dah). The thymus was initially composed of  
814 lymphoblasts and thymocytes were observed at 20-25 dah, with a distinction between  
815 cortex and medulla being observed after 35 dah. Lymphohemopoietic tissue was not  
816 observed in the head kidney until 25 dah, when the spleen also became erythroid.  
817 Melanomacrophage centers were observed in both kidney and spleen after 50 dah.  
818 Knowledge about the immune system of larvae and juvenile of P. orbignyanus will help  
819 enhance the production and survival rates through the use of vaccines and  
820 immunostimulants.

828 The Brazilian flounder Paralichthys orbignyanus belongs to the family  
829 Paralichthyidae (order Pleuronectiformes) and usually occurs near estuarine regions.  
830 This species is distributed from the coast of the State of Rio de Janeiro, Brazil, to Mar  
831 del Plata, Argentina (Figueiredo and Menezes 2000) and is the largest flatfish species in  
832 southern Brazil, which reinforces its commercial value and, therefore, its potential for  
833 aquaculture. Several studies have been conducted on the biology and the viability of the  
834 species for aquaculture, with already defined protocols for reproduction and larviculture  
835 in captivity (Cerqueira 2005; Bianchini et al. 2010).

836 The major lymphoid organs in fish – thymus, spleen and kidney – are important to  
837 the development of innate and acquired immune responses during the life cycle of  
838 organisms (Bowden et al. 2005; Magnadóttir et al. 2005). Extensive investigations have  
839 been conducted on the ontogeny of lymphoid organs of important commercial species –  
840 e.g. Salmo salar (Ellis 1977), Sparus aurata (Josefsson and Tatner 1993), Danio rerio  
841 (Danilova et al. 2004), Thunnus orientalis (Watts et al. 2003), Dicentrarchus labrax  
842 (Santos et al. 2000), Ictalurus punctatus (Petrie-Hanson and Ainsworth 2001), among  
843 others. However, the identification of early hematopoietic lymphoepithelial sites, the  
844 origin of B and T lymphocytes and the acquisition of complete immune capabilities  
845 remain unclear (Zapata et al. 2006).

846 Fish diseases are a constant problem in aquaculture and may be caused by viruses,  
847 bacteria, protozoa, parasites, nutritional deficiencies or stress and lead to several  
848 economic losses around the world, especially in intensive farming systems (Hetch and  
849 Endemann 1998; Bondad-Reantaso et al. 2005; Subasinghe 2005; Nowak 2007). The  
850 treatment of fish diseases presents several difficulties, as the use of antibiotics is  
851 emergency only and may be harmful for the environment and for humans (Hair 1998;  
852 Alderman and Hastings 2006).

853 No reports in the literature can be found about the ontogeny of the lymphoid  
854 organs of the Brazilian flounder. In order to improve therapeutic and prophylactic  
855 measures in the rearing systems, an understanding of the larval fish immune system is  
856 an essential pre-requisite to the use of disease-specific vaccines (Chantanachookhin et  
857 al. 1991). Though the knowledge about the species mentioned above is of great  
858 importance to their possible use in aquaculture, their larval rearing is still marked by  
859 high and variable mortality rates, which makes final survival results rather  
860 unpredictable. Therefore, this paper examines the development of lymphoid in larvae

861 and juveniles of the Brazilian flounder P. orbignyanus in order to improve the  
862 technological package that is being developed in the region.

863

864

## 865 **Material and Methods**

866

867 Wild broodstock of Brazilian flounder were caught by artisanal fisheries at  
868 Cassino Beach (32°30'S, 52°30'W, Rio Grande, RS, Brazil) and maintained in the  
869 Laboratory of Estuarine and Marine Fish Culture of the Federal University of Rio  
870 Grande (FURG). All adults in the fertilization trials were acclimated to salinity 35 and  
871 were used only once. Females with oocyte diameter larger than 400 µm were induced to  
872 spawn with carp pituitary extract (3 mg/kg) and they were maintained individually in  
873 tanks with 180 L of seawater at 23 C. They were ready for stripping 24 to 36 h after the  
874 hormone was injected. Artificial fertilization was performed with a dry method  
875 according to Sampaio et al. (2008). The hatchery was held in 15 L tanks with constant  
876 aeration, temperature of 24 C, salinity between 25 and 30 and constant illumination.  
877 The larvae were fed with rotifers (Brachionus plicatilis) and Artemia nauplii during the  
878 first 30 days after hatching (dah), which were gradually replaced by artificial diet from  
879 30 dah onwards (Rocha et al. 2008).

880 Larvae and juvenile of P. orbignyanus provenient from two artificial fertilizations  
881 (0 to 10, 15, 20, 25, 30, 40 and 50 dah; n = 10 per age) were euthanized with benzocaine  
882 (30 ppm) and fixed in Bouin's liquid. Whole larvae were embedded sagittally in paraffin  
883 through routine histological processing, sectioned (3-5 µm) and stained with  
884 hematoxylin-eosin. Lymphoid tissues were analyzed under optic microscopy (Olympus  
885 BH-2) and photographed with a digital camera.

886

## 887 **Results**

888

889 The mean length of the larvae and juvenile of P. orbignyanus are shown in Table  
890 1. The length of newly-hatched larvae was xxx and xxx when they were 50 days old.  
891 The lymphoid organs appeared in the following sequence: kidney, thymus and spleen in  
892 the flounder (1, 5 and 10 dah) (Table 2).

893 The thymus is a paired organ located dorso-posteriorly in the pharyngeal cavity.  
894 This organ seems to face the anterior kidney and no cell “barriers” were observed  
895 between these organs in all fish examined. In the Brazilian flounder (Fig. 1A), the  
896 thymus is surrounded by the pharyngeal epithelial monolayer. Later, the pharyngeal  
897 epithelium encapsulates the thymus (Fig. 1B), with few mucous cells and more layers of  
898 epithelial cells.

899 The thymus is initially composed of large basophilic cells, the lymphoblasts,  
900 which were strongly stained undifferentiated cells in all fish examined. Thymocytes  
901 were observed between 20 and 25 dah in the flounder. Zones were distinguishable in the  
902 thymus of flounder by 20 dah. These zones were differentiated into an outer cortex with  
903 small packed lymphocytes, and an inner medulla with epithelioid-type cells. After 50  
904 dah, Hassal-like corpuscles and myoid cells were occasionally observed in the  
905 medullary zone of the thymus of the flounder. This organ showed an increase in size  
906 and volume through the development, becoming an elongated organ across the dorsal  
907 posterior branchial cavity.

908 The kidney initially consisted of a simple tube, running along the notochord and  
909 opening to the anus, with no lymphohemopoietic tissue present. Few undifferentiated  
910 stem cells (larger cells with prominent nucleus) began to appear among the tubules and  
911 at 25 dah in the flounder (Fig. 1C). These cells were clearly visible and became darker  
912 and smaller, probably indicating the occurrence of lymphopoiesis. The proportion of  
913 lymphohemopoietic tissue increased, particularly at the pronephros or anterior kidney.  
914 The mesonephros or trunk kidney became mainly excretory, occupied by tubules and  
915 erythrocytes (Fig. 1D). Melano-macrophages could be seen in the kidney of flounder  
916 around 35 dah.

917 The spleen initially consisted of a small cluster of mesenchymal cells and blood  
918 capillaries adjacent to the gut and pancreas (Fig. 1E). The spleen of flounder became  
919 erythroid by 25 dah. Melano-macrophage centers (MMCs) were observed at 50 dah  
920 (Fig. 1F). The spleen increased rapidly in size and volume, acquiring an elliptical shape,  
921 and no obvious white pulp and red pulp could be observed.

922

923

## Discussion

924

925 The sequence of development of lymphoid organs (kidney, spleen and thymus) is  
926 similar to most marine teleost fish reported in the literature (Table 1)

927 (Chantanachookhin et al. 1991; Josefsson and Tatner 1993; Padrós and Crespo 1996;  
928 Watts et al. 2003). However, in the Brazilian flounder, the thymus was formed prior to  
929 the appearance of the spleen, which was also observed in Hippoglossus hippoglossus  
930 (Patel et al. 2009) and some freshwater fish (Padrós and Crespo, 1996). In contrast,  
931 some marine species have been reported to have a different order of organ development  
932 (Patel et al. 2009). The differences in the embrionic and larval stages during the  
933 development of these species could explain the variation observed in the ontogenic  
934 sequence of lymphoid organ development.

935         The maturation of the thymus and kidney may be associated with the timing of  
936 first feeding, which can be also the first exposure to potential pathogens  
937 (Chantanachookhin et al. 1991). The embrionic stage of the flounder is not long when  
938 compared to the other species, so that larvae systems are not fully developed at the  
939 moment of the hatching. The digestive tract of flounder larvae is only opened by 3 or 4  
940 dah. A few days after the first feeding stage, the thymus can be observed in a strategic  
941 localization at the dorso-posterior region of the pharyngeal cavity. For this species, the  
942 exposure to environmental antigens occurs too early in development for the adaptive  
943 immune system to be functional. Therefore, the larvae must rely on non-specific and  
944 maternal transfer of antibodies (Patel et al. 2009).

945         The maturity of the immune system is marked by the presence of mature T- and  
946 B-cells and antigen-presenting cells. However, histological studies are indirect  
947 assessments, as appearance does not necessarily correlate with maturity (Zapata et al.  
948 1997). It is difficult to differentiate T- and B-cells through classical histology, because  
949 specific monoclonal antibodies are required for their identification. However, it is likely  
950 that the thymus is the primary lymphoid organ for T-cells and the anterior kidney is the  
951 primary lymphoid organ for B-cells, as suggested for most other species (Grontvedt and  
952 Espelid 2003). It is not possible to tell from these studies in which of these organs (or  
953 both) the stem cells originate (Watts et al. 2003). Due to variations in the methods  
954 employed to study development, direct comparison between different species is  
955 difficult. These variations can also be caused by several biological factors, especially  
956 those affecting development during the early life stages (Patel et al. 2009).

957         In terms of lymphoid development, the thymus became lymphoid before the  
958 kidney, though more research with immunohistochemistry and gene expression are  
959 being developed to effectively determine when the thymic lymphocytes become  
960 immunocompetent. The development and maturation of the thymus and its

961 differentiation into cortex and medulla varies among fish species. Differentiation of the  
962 thymus into distinct zones has been observed in species such as Atlantic cod (Schroeder  
963 et al. 1998), turbot (Padrós and Crespo 1996) and sea bass (Santos et al. 2000). Watts et  
964 al. (2003) stated that lymphocytes require stromal epithelial and dendritic cells in the  
965 thymus to become immunocompetent. As epithelioid cells appeared and distinct zones  
966 began to differentiate by 25 dah in the flounder, the microenvironment necessary for the  
967 activation of lymphocytes might be present and these results are in agreement with those  
968 mentioned above.

969         The thin covering of pharyngeal epithelium in the early thymus of flounder may  
970 directly expose this organ to antigens, as observed by other researchers (Watts et al.  
971 2003). However, the thymic epithelium observed in juveniles may function as an  
972 effective antigen barrier, as observed by Castillo et al. (1998) in the rainbow trout. This  
973 epithelium may have an antibody-secreting role, though more studies are necessary to  
974 be developed about its origin and role in the thymus development.

975         The thymus did not involute along the study period in all fish examined. Liu et al.  
976 (2004) reported, in the Japanese flounder *P. olivaceus*, an early involution of the thymus  
977 by seven months after hatching, though the flounder matures at about three years old.  
978 Factors such as age, season, environmental stress and hormonal cycles could affect the  
979 thymus involution (Liu et al. 2004). Thus, a longer study would be necessary to  
980 determine the period of thymic involution of the species in this study and the factors  
981 that influence this involution.

982         The excretory kidney was the first organ to appear in this study. Lympho-  
983 hemopoietic cells were only observed later in the development of flounder. This would  
984 give support to the hypothesis that pronephritic stem cells colonize the thymic  
985 primordium and then undergo differentiation (Ellis 1977; Padrós and Crespo 1996). In  
986 contrast, the appearance of lympho-hemopoietic tissue in the pronephros after the  
987 thymus is observed is controversial and the reasons for this variation remain unclear.  
988 The head kidney is an important hemopoietic and lymphoid organ in fish, and a major  
989 source of antibody producing cells, which is corroborated by the increase in size and  
990 volume of the pronephros in all fish examined, and a clear distinction between  
991 pronephros and mesonephros, which is essentially excretory.

992         The spleen acts processing, storing and maturing erythrocytes, neutrophils and  
993 granulocytes (Cunha et al. 2008). This organ remained mainly erythroid throughout the  
994 period studied. The antigen-trapping function, evidenced by the high degree of



995 vascularization, was noted in this study. According to Chantanachookhin et al. (1991),  
996 an earlier development of the spleen suggests that this organ may possibly have a  
997 phagocytic function before immunocompetence is attained. The fish spleen can be  
998 divided into red and white pulp, however this division was not observed in this study. In  
999 addition, melanomacrophage centers and lymphocytes in association with blood vessels  
1000 were observed at the later stages in all fish examined, suggesting a fully operational  
1001 immune system (Press and Evensen 1999).

1002 For aquaculture activities, it is important to estimate the correct age for the use of  
1003 vaccines, and the emergence of acquired immunity is evidenced by the appearance of B  
1004 lymphocytes (Heppel and Davis 2000). Before this time, the innate defense offer better  
1005 protection for fish (Rombout et al. 2005). It is necessary to know when the fish begin to  
1006 have acquired immune response, so that the vaccines may be effective (Heppel and  
1007 Davis 2000; Mulero et al. 2008; Tonheim et al. 2008). As tolerance to certain antigens  
1008 can occur, an early vaccination is not advisable (Padrós and Crespo, 1996). In this  
1009 study, the lymphoid organs of *P. orbignyanus* started to appear at 5 dah, and lymphoid  
1010 cells were observed in these organs after 25 dah, which suggests that after this period it  
1011 may be possible to vaccinate juvenile without the risk of acquiring tolerance. Taking  
1012 into account that immunocompetence during the early life of the larvae relies mainly on  
1013 non-specific defense mechanisms, the correct age when the immune system is fully  
1014 functional and the possibility of enhancing innate mechanisms before this moment in  
1015 this species through immunostimulants should be investigated.

1016

1017

### Acknowledgments

1018 L. Romano and L.A. Sampaio received productivity and research fellowships  
1019 from the Brazilian Council of Research, CNPq (Process number PQ 301002/2012-6 and  
1020 308014/2009-3).

1021

1022

### References

1023

1024 Alderman, D. J. and T. S. Hastings. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of  
1025 antibiotic resistance – potential for consumer health risks. International Journal of  
1026 Food Science and Technology, 33:139-155.

1027 Bianchini, A., R. B. Robaldo and L. A. Sampaio. 2010. Cultivo do linguado  
1028 (Paralichthys orbignyanus). In B. Baldisserotto and L.C. Gomes, editors. Espécies  
1029 nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. Santa Maria: UFSM.

1030 Bondad-Reantaso, M. G., R. P. Subasinghe, J. R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R.  
1031 Adlard, Z. Tan and M. Shariff. 2005. Disease and health management in Asian  
1032 aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132:249-272.

1033 Bowden, T. J., P. Cook and J. H. W. M. Rombout. 2005. Development and function of  
1034 the thymus in teleosts. *Fish & Shellfish Immunology* 19:413-27.

1035 Castillo, A., B. Razquin, A. J. Villena, A. G. Zapata and P. Lopez-Fierro. 1998. Thymic  
1036 barriers to antigen entry during the post-hatching development of the thymus of  
1037 rainbow trout, Oncorhynchus mykiss. *Fish & Shellfish Immunology* 8:157-170.

1038 Cerqueira, V. R. 2005. Egg development of Paralichthys orbignyanus (Valenciennes,  
1039 1839). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48(3):459-465.

1040 Chantanachookhin, C., T. Seikai and M. Tanaka. 1991. Comparative study of the  
1041 ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquaculture*  
1042 99:143-155.

1043 Cunha, M. C.; Makridis, P.; Soares, F.; Rodrigues P.; Dinis, M. T. 2008. Timing of  
1044 appearance of lymphoid cells during early development of Senegalese sole, Solea  
1045 senegalensis Kaup. *Journal of the World Aquaculture Society* 39: 436-439.

1046 Danilova, N., V. S. Hohman, F. Sacher, T. Ota, C. E. Willett and L. A. Steiner. 2004. T  
1047 cells and the thymus in developing zebrafish. *Developmental and Comparative*  
1048 *Immunology* 28:755-767.

1049 Ellis, A. E. 1977. Ontogeny of the immune response in Salmo salar. Histogenesis of the  
1050 lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed  
1051 leucocyte reactivity. Pages 225-232 in J.B. Soloman and J.B. Horton, editors.  
1052 *Developmental immunobiology. Proceedings of the symposium on developmental*  
1053 *immunobiology held in Aberdeen 5–9 Sept. Amsterdam: Elsevier/North-holland*  
1054 *Biochemical Press.*

1055 Figueiredo, J. L. and N. A. Menezes. 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do  
1056 Brasil. Volume VI. São Paulo: Museu de Zoologia: Universidade de São Paulo.

1057 Grøntvedt, R. N. and S. Espelid. 2003. Immunoglobulin producing cells in the spotted  
1058 wolffish (Anarhichas minor Olafsen): localization in adults. *Developmental and*  
1059 *Comparative Immunology* 27:569-578.

1060 Hachero-Cruzado, I., J. B. Ortiz-Delgado, B. Borrega, M. Herrera, J. I. Navas and C.  
1061 Sarasquete. 2009. Larval organogenesis of flatfish brill Scophthalmus rhombus L:  
1062 Histological and histochemical aspects. *Aquaculture* 286:138-149.

1063 Hecht, T. and F. Endemann. 1998. The impact of parasites, infections and diseases on  
1064 the development of aquaculture in sub-Saharan Africa. *Journal of Applied*  
1065 *Ichthyology* 14:213-221.

1066 Heppel, J. and J. L. Davis. 2000. Application of DNA vaccine technology to  
1067 aquaculture. *Advanced Drug Delivery Reviews* 43:29-43.

1068 Josefsson, S. and M. F. Tatner. 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream  
1069 (Sparus aurata L.). *Fish & Shellfish Immunology* 3:35-49.

1070 Kato, K., K. Ishimaru, Y. Sawada, J. Mutsuro, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai.  
1071 2004. Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile  
1072 kelp grouper Epinephelus bruneus reared in the laboratory. *Fisheries Science*  
1073 70:1061-1069.

1074 Liu, Y., S. Zhang, G. Jiang, D. Yang, J. Lian and Y. Yang. 2004. The development of  
1075 lymphoid organs of flounder, Paralichthys olivaceus, from hatching to 13 months.  
1076 *Fish & Shellfish Immunology* 16:621-632.

1077 Magnadóttir, B., S. Lange, S. Gudmundsdóttir, J. Bogwald and R. A. Dalmo. 2005.  
1078 Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*  
1079 19:429-439.

1080 Mulero, I., M. P. Sepulcre, I. Fuentes, I. García-Alcázar, J. Meseguer, A. García-Ayala  
1081 and V. Mulero. 2008. Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream  
1082 reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive  
1083 immunocompetence. *Molecular Immunology* 45:2981-2989.

1084 O'Neill, J. G. 1989. Ontogeny of the lymphoid organ in an Antarctic teleost, Harpagifer  
1085 antarcticus (Notothenioidei: Perciformes). *Developmental and Comparative*  
1086 *Immunology* 13:25-33.

1087 Padrós, F. and S. Crespo. 1996. Ontogeny of lymphoid organs in the turbot  
1088 Scophthalmus maximus: a light and electron microscope study. *Aquaculture*  
1089 144:1-16.

1090 Patel, S., E. Sorhus, I. U. Fiksdal, P. G. Espedal, O. Bergh, O. M. Rodseth, H. C.  
1091 Morton and A. H. Nerland. 2009. Ontogeny of lymphoid organs and development  
1092 of IgM-bearing cells in Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.). *Fish &*  
1093 *Shellfish Immunology* 26:385-395.

- 1094 Petrie-Hanson, L. and A. J. Ainsworth. 2001. Ontogeny of channel catfish lymphoid  
1095 organs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 81:113-127.
- 1096 Press, C. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost  
1097 fishes. *Fish & Shellfish Immunology* 9:309-318.
- 1098 Rocha, A. F., C. V. A. Carvalho and L. A. Sampaio. 2008. Produção de juvenis do  
1099 linguado Paralichthys orbignyanus: efeito da duração do período de co-  
1100 alimentação durante o desmame. *Ciência Rural* 38(8):2334-2338.
- 1101 Romano, N., M. Fanelli, G. M. Papa, G. Scapigliati and L. Mastrolia. 1999. Histological  
1102 and cytological studies on the developing thymus of sharpsnout seabream,  
1103 *Diplodus puntazzo*. *Journal of Anatomy* 194:39-50.
- 1104 Rombout, J. H. W. M., H. B. T. Huttenhuis, S. Picchiatti and G. Scapigliati. 2005.  
1105 Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology*  
1106 19:441-455.
- 1107 Sampaio, L. A., R. B. Robaldo and A. Bianchini. 2008. Hormone-induced ovulation,  
1108 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder Paralichthys orbignyanus  
1109 (Valenciennes, 1839). *Aquaculture Research*, 39:712-717.
- 1110 Santos, N. M. S., N. Romano, M. Sousa, A. E. Ellis and J. H. W. M. Rombout. 2000.  
1111 Ontogeny of B and T cells in sea bass (Dicentrarchus labrax L.). *Fish & Shellfish*  
1112 *Immunology* 10:583-596.
- 1113 Schroeder, M. B., A. J. Villena and T. O. Jorgensen. 1998. Ontogeny of lymphoid  
1114 organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (Gadus morhua L.).  
1115 *Developmental and Comparative Immunology* 22(5-6):507-517.
- 1116 Tonheim, T. C., J. Bogwald and R. A. Dalmo. 2008. What happens to DNA vaccine in  
1117 fish? A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 25:1-18.
- 1118 Watts, M., K. Kato, B. L. Munday and C. M. Burke. 2003. Ontogeny of immune system  
1119 organs in northern bluefin tuna (Thunnus orientalis, Temminck and Schlegel 1844).  
1120 *Aquaculture Research* 34:13-21.
- 1121 Zapata, A. G., M. Torroba, A. Varas and E. Jimenez. 1997. Immunity in fish larvae.  
1122 Pages 23-32 in R. Gudding, A. Lillehaug, P. J. Midtlyng and P. J. Brown. *Fish*  
1123 *Vaccinology* Karger, Basle.
- 1124 Zapata, A., B. Diez, T. Cejalvo, C. Gutiérrez-De Frías and A. Cortés. 2006. Ontogeny  
1125 of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20:126-136.
- 1126

1127 Table 1. Mean length of *Paralichthys orbignyana* larvae and juvenile from 0 (newly-  
1128 hatched larvae) to 50 days after hatching (dah). Data are presented as mean  $\pm$  standard  
1129 error.

Age (dah)	Length (mm)
0	1,671 $\pm$ 0,014
2	2,556 $\pm$ 0,015
3	2,725 $\pm$ 0,014
4	2,841 $\pm$ 0,033
5	2,797 $\pm$ 0,069
6	3,041 $\pm$ 0,105
7	3,241 $\pm$ 0,032
8	3,606 $\pm$ 0,074
9	3,880 $\pm$ 0,077
10	4,092 $\pm$ 0,083
15	4,839 $\pm$ 0,113
20	6,762 $\pm$ 0,260
25	7,982 $\pm$ 0,119
30	8,247 $\pm$ 0,188
35	8,397 $\pm$ 0,310
40	10,079 $\pm$ 0,363
45	12,098 $\pm$ 0,679
50	16,333 $\pm$ 0,929

1130

1131

1132

1133

1134

1135

1136

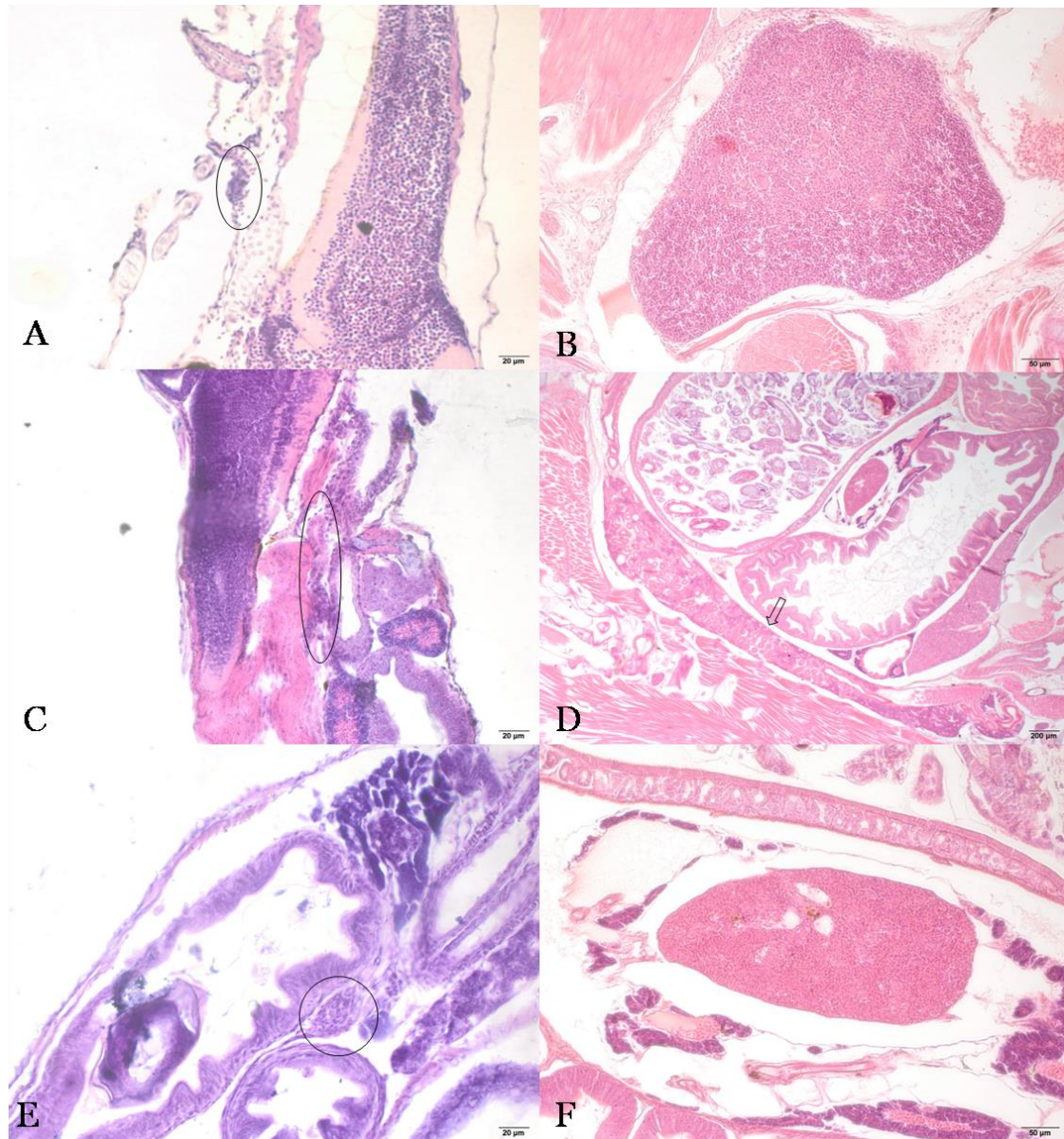
1137

1138

1139 Table 2. Development in days after hatching of the immune organs of some marine  
 1140 teleost fish. A = appearance, L = lymphocytes distinguished.

Species	Kidney		Spleen		Thymus		Reference
	A	L	A	L	A	L	
<u>Seriola quinqueradiata</u>	1	26	3	30	11	20	Chantanachookhin et al. (1991)
<u>Pagrus major</u>	0	31	3	36	11	22	Chantanachookhin et al. (1991)
<u>Paralichthys olivaceus</u>	7	28	8	30	10	21	Chantanachookhin et al. (1991) Liu et al. (2004)
<u>Scophthalmus maximus</u>	0	-	9- 10	-	16	-	Padrós & Crespo (1996)
<u>Sparus aurata</u>	1	45- 47	12	-	22-29	29- 47	Josefsson & Tatner (1993)
<u>Solea senegalensis</u>	3	6	6	121	9	-	Cunha et al (2008)
<u>Hippoglossus</u>	0	40- 45	59	-	27	41	Patel et al. (2009)
<u>Scophthalmus rhombus</u>	1	10- 12	2	-	-	-	Hachero-Cruzado et al. (2009)
<u>Gadus morhua</u>	-	5	6- 21	-	28	-	Schroeder et al. (1998)
<u>Diplodus puntazzo</u>	-	-	-	-	20	51	Romano et al. (1999)
<u>Harpagifer antarcticus</u>	1	-	21- 28	-	21-28	-	O'Neill (1989)
<u>Thunnus orientalis</u>	1	7	2	30	5	7	Watts et al. (2003)
<u>Epinephelus bruneus</u>	1	30	6	33	12	21	Kato et al. (2004)
<u>Paralichthys orbignyanus</u>	1	25	10	-	5	15- 20	This study

1141  
 1142  
 1143  
 1144  
 1145  
 1146



1147

1148

1149 Figure 1. Lymphoid organs of larvae and juvenile of Paralichthys orbignyanus. A.

1150 Primordial thymus at 5 dah. (Scale bar: 20 µm). B. Thymus at 50 dah, with distinct

1151 inner (with myoid eosinophilic cells) and outer (more basophilic) zones (Scale bar: 50

1152 µm). C. Kidney at 4 dah, with only a renal tubule (Scale bar: 20 µm). D. Kidney at 50

1153 dah, remarkably differentiated into pronephros (anterior kidney) and mesonephros

1154 (trunk kidney) (Scale bar: 200 µm). E. Spleen at 10 dah (Scale bar: 20 µm). F. Spleen at

1155 50 dah, with MMCs and sinusoid capillaries (Scale bar: 50 µm).

1156

1157

1158

1159  
1160  
1161  
1162  
1163  
1164  
1165  
1166  
1167  
1168  
1169  
1170  
1171  
1172  
1173  
1174  
1175  
1176  
1177  
1178  
1179  
1180  
1181  
1182  
1183  
1184  
1185  
1186  
1187  
1188  
1189  
1190  
1191

## CAPÍTULO 2

**Expression of immune-related genes during the early stages of Brazilian flounder  
(*Paralichthys orbignyanus*) development**

Emeline P. Gusmão, Márcio A. Figueiredo, Marcelo H. Okamoto, Luís A. Sampaio,  
Luis F. Marins

Artigo submetido a Fish & Shellfish Immunology



1192 **Expression of immune-related genes during the early stages of Brazilian flounder**  
1193 **(*Paralichthys orbignyanus*) development**

1194

1195

1196 **Abstract**

1197 Although the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* has great potential for  
1198 aquaculture activities, knowledge on the ontogeny of its immune system would be  
1199 important to improve the survival and growth in the early stages of development of this  
1200 species. If fish are immunized before they are immunocompetent, there is a risk of  
1201 inducing immunological tolerance instead of improving their immunity. This study  
1202 examines the expression of immune-related genes in larvae and juveniles of the  
1203 Brazilian flounder *P. orbignyanus* in order to improve the technological package that is  
1204 being developed in the region for this candidate species for aquaculture activities. The  
1205 real-time PCR studies and previous histological studies show that the immune system of  
1206 the Brazilian flounder starts to develop around 5 days after hatching (dah) with the  
1207 appearance of thymus, with the subsequent expression of RAG1 proteins that lead to the  
1208 process of V(D)J recombination of the TCR on T cells. TCR, together with CD3, form  
1209 the TCR complex that is able to interact with MHC molecules, process that is stabilized  
1210 by the CD4 co-receptor on the surface of helper T cells, which interact specifically with  
1211 MHC class II molecules. CD3 and CD4-2 mRNA levels are increased at around 30 dah,  
1212 suggesting that T lymphocytes, especially helper T cells, are mature and able to  
1213 recognize antigens carried by the antigen presenting cells. An increase in the expression  
1214 levels of the cytokine IL-1 $\beta$  at 30 dah also suggests that juveniles at this age can  
1215 possibly respond to infection with an inflammatory condition.

1216

1217 **Keywords:** Brazilian flounder; *Paralichthys orbignyanus*; T cell markers; IL-  
1218 1 $\beta$ ; RAG1; development.

1219

1220 **1. Introduction**

1221

1222 The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1842)  
1223 (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) is distributed from Rio de Janeiro, Brazil, to Mar  
1224 del Plata, Argentina (Figueiredo and Menezes, 2000) and usually occurs near estuarine  
1225 regions. This is the largest flatfish species in southern Brazil, with a great commercial

1226 value and potential for aquaculture. Studies on the biology and viability of the species  
1227 for aquaculture have been conducted in the last decades, such as tolerance to nitrogen  
1228 compounds (Bianchini et al., 1996), pH (Wasielesky et al., 1997), temperature  
1229 (Wasielesky et al., 1998) and salinity (Sampaio and Bianchini 2002; Sampaio et al.,  
1230 2007, 2001). In addition, well-defined protocols for reproduction and larviculture of the  
1231 flounder in captivity have been established and improved (Cerqueira, 2005; Rocha et  
1232 al., 2008; Sampaio et al., 2008; Bianchini et al., 2010). However, significant mortality  
1233 has continuously been recorded at the early stages of development of Brazilian flounder.  
1234 Poorly developed larvae at hatching, relatively long live feed stage with inadequate  
1235 nutritional quality of prey, metamorphosis and weaning are considered critical factors  
1236 for the survival of larvae and juveniles. Nonetheless, although the Brazilian flounder  
1237 has great potential for aquaculture activities, knowledge on the ontogeny of its immune  
1238 system would be important to improve the survival and growth in the early stages of  
1239 development of this species.

1240         The immune organs in teleosts and their development have been widely studied  
1241 in different important teleost species for aquaculture (Chantanachookhin et al., 1991;  
1242 Josefsson and Tatner, 1993; Padrós and Crespo, 1996; Patel et al., 2009; Romano et al.,  
1243 1999; Schroder et al., 1998; Zapata et al., 2006). Fish larvae lack a fully-developed  
1244 immune response before their immune system is mature. Most studies on the  
1245 development of immune organs in fish have been carried out using histology as the  
1246 main technique, showing, for example, the appearance of lymphocytes in a lymphoid  
1247 organ. Recently, immune genes were demonstrated to be good markers in the study of  
1248 maturity of the immune system and potentially give a more accurate measure of the  
1249 initial development of immunocompetence (Corripio-Miyar et al., 2007). Functional  
1250 immune activities of teleosts are poorly investigated, or deduced by the close similarity  
1251 between immune genes of fish and mammals (Randelli et al., 2008). Immunological  
1252 competence of fish leucocytes should be determined on both histological observation of  
1253 organ development together with observations on lymphocyte functionality (Zapata et  
1254 al., 2006).

1255         In the process of recognizing infected cells, antigen presenting cells and T cells  
1256 play important roles in the development of an adequate immune response. The major  
1257 histocompatibility complex (MHC) molecules are expressed on the surface of antigen  
1258 presenting cells, which interact with T-cell receptors (TCR) on the surface of T  
1259 lymphocytes. These molecules, together with CD3 co-receptor, comprise the TCR

1260 complex. The CD3 molecule is found on the membranes of all mature T cells, and in  
1261 virtually no other cell type, which makes it a useful immunohistochemical marker for T  
1262 cells in tissue sections (Fischer et al., 2013; Øvergård et al., 2009; Park et al., 2001).

1263 T cells can be divided in two major subsets based on the expression of other two  
1264 co-receptors that stabilize the TCR/antigen-MHC complex: CD4, carried by the helper  
1265 T cells (T4 cells or CD4+ cells), and CD8, carried by cytotoxic T cells (T8 cells or  
1266 CD8+ cells) (Øvergård et al., 2011). CD4 binds to the MHC class II molecule to  
1267 establish specific immunity, whereas CD8 binds to MHC class I molecule, mediating  
1268 the destruction of infected or malignant host cells. The expression of CD4 and CD8 co-  
1269 receptors is critical for cell-mediated immune defense and T cell development in the  
1270 thymus (Sun et al., 2007). Helper T cells send signals to other types of immune cells,  
1271 including cytotoxic T cells (Patel et al., 2009). T cell populations in fish have not been  
1272 fully defined because of the lack of suitable markers for T lymphocytes in fish (Laing et  
1273 al., 2006).

1274 Mammals possess an enormous repertoire of Ig and TCR proteins to match  
1275 antigens from almost all natural pathogens, including bacteria, viruses, parasites, and  
1276 also dysfunctional cells such as tumor cells. This repertoire is generated primarily  
1277 through a process called V(D)J recombination. V(D)J recombination is a mechanism of  
1278 genetic recombination in the early stages of Ig and TCR production, mediated by the  
1279 recombination activating gene 1 (RAG1) and 2 (RAG2) (Zhu et al., 2013). RAG1 is  
1280 highly regulated, with its expression limited not only to lymphoid-specific cells, but  
1281 also to precise stages in the developmental cycle of these cells, and it has been  
1282 extensively studied in fish due to its importance in the development of a functional  
1283 immune system (Corripio-Miyar et al., 2007; Covello et al., 2013; Huttenhuis et al.,  
1284 2005; Øvergård et al., 2011; Willett et al., 1997; Zhu et al., 2013).

1285 Cytokines are important modulators of the vertebrate immune system that helps  
1286 both innate and adaptive responses. Interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) is a member of the  
1287 interleukin 1 family of cytokines and an important mediator of the inflammatory  
1288 response, promoting a cascade of reactions that lead to inflammation. IL-1 $\beta$  is also  
1289 involved in the regulation of immune relevant genes, lymphocyte activation, migration  
1290 of leucocytes, phagocytosis and bactericidal activities, though it shows more potent  
1291 function in humoral immune responses (Zhu et al., 2013). IL-1 $\beta$  is mainly produced  
1292 from monocytes and macrophages and secreted into the circulatory system, expressed at  
1293 low levels under normal conditions (Lu et al., 2003). To date, IL-1 $\beta$  has been cloned

1294 from many species of teleost fish (Corripio-Miyar et al., 2007; Covello et al., 2009;  
1295 Fujiki et al., 2000; Secombes et al., 2011).

1296 This study examines the expression of immune-related genes in larvae and  
1297 juveniles of the Brazilian flounder *P. orbignyanus* in order to improve the technological  
1298 package that is being developed in the region for this candidate species for aquaculture  
1299 activities.

1300

## 1301 **2. Material and methods**

1302

### 1303 **2.1. Larval rearing**

1304

1305 Wild broodstock of the Brazilian flounder were caught by artisanal fisheries in  
1306 Cassino Beach (32°30'S, 52°30'W, Rio Grande, RS, Brazil) and maintained into the  
1307 Laboratory of Estuarine and Marine Fish Culture of the Federal University of Rio  
1308 Grande (FURG). Females were induced to spawning using the hormone HCG (250  
1309 UI.kg<sup>-1</sup>), according to Sampaio et al. (2008). The hatchery was held in 15 L with  
1310 constant aeration, temperature of 24°C, salinity between 25 and 30 g L<sup>-1</sup> and constant  
1311 lighting. The larvae were fed with the rotifer *Brachionus plicatilis* during the first 15  
1312 days after hatching (dah), along with microalgae (*Nannochloropsis oculata*) – technique  
1313 of green water. The rotifer was replaced by *Artemia* sp., and 20 to 30 dah, the live food  
1314 was gradually replaced by artificial diet (Rocha et al., 2008).

1315

### 1316 **2.2. Gene expression analysis**

1317

#### 1318 **2.2.1. Synthesis of the complementary DNA (cDNA)**

1319

1320 Due to the small size of larvae in early development, it was not feasible to  
1321 isolate separate organs. Therefore, 5-7 pools of whole larvae and juvenile were collected  
1322 to extract total RNA at 3 days after hatching (dae), when the larvae started feeding  
1323 exogenously (n = 70); at 10 dae, when the lymphoid organs were histologically  
1324 observed (n = 60); at 15 and 30 dae, which corresponded to the beginning and the end  
1325 of the metamorphosis (n = 50 and 6, respectively); at 45 dae, when the juvenile were  
1326 weaned (n = 3); and at 60 dae (n = 3). Total RNA was extracted using Trizol  
1327 (Invitrogen) method according to the manufacturer's instructions, and the integrity was

1328 verified through electrophoresis in agarose gel 1%. The cDNA was confectioned with  
1329 High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems), following the  
1330 manufacturer's instructions.

1331

### 1332 **2.2.2. Isolation of immune-related genes**

1333

1334 Genomic DNA was extracted from back dorsal samples of muscle tissue through  
1335 AxyPrep MultiSource Genomic DNA Miniprep kit (Axygen), according to the  
1336 manufacturer's instructions. Quality of the DNA was verified through electrophoresis in  
1337 agarose gel 1%. A polymerase chain reaction (PCR) using degenerate primers was  
1338 performed from the sequences of other flatfish available in GenBank. The sequences of  
1339 primers used in this stage are shown in Table 1. The size of the segments expected for  
1340 CD3, CD4-2, RAG1 and IL-1 $\beta$  were 900 bp, 2,000 bp, 600 bp and 1800 bp,  
1341 respectively. All PCR reactions of this stage had the final volume of 12.5  $\mu$ L, containing  
1342 1.25  $\mu$ L of 10X PCR buffer, 0.375  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 0.25  $\mu$ L of dNTP (10mM), 0.25  
1343  $\mu$ L of each primer (0.2 mM), 0.5  $\mu$ L DNA, 0.1  $\mu$ L of Platinum Taq polymerase (5  
1344 U/ $\mu$ L) (Invitrogen) and 9.525  $\mu$ L of Ultra Pure Water (Invitrogen). The program used in  
1345 the thermo cycler for the reaction was: 2 min at 94 °C, 30 s at 94 °C, 1 min at 60 °C, 1  
1346 min at 72 °C for RAG1 and CD3 or 2.5 min at 72 °C for CD4-2 and IL-1 $\beta$ , and final  
1347 extension of 5 min at 72 °C for RAG-1 and CD3 or 10 min at 72 °C for CD4-2 and IL-  
1348 1 $\beta$ . The number of cycles was 35 for both genes. The product obtained in PCRs was  
1349 analyzed by electrophoresis in 1.0% agarose gel with ethidium bromide 0.5 $\mu$ g/mL for  
1350 confirmation of the expected size. After confirmation, the fragments of DNA were  
1351 extracted from the gel and purified according to the protocol suggested by the  
1352 manufacturer of the kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare Life  
1353 Sciences), and sequenced. The obtained sequence was submitted to GenBank to  
1354 determine the levels of homology with available sequences, with exons/introns  
1355 identification. Specific primers CD3, CD4-2, RAG-1 and IL-1 $\beta$  were designed  
1356 according to the obtained sequences and they were used in the analysis of gene  
1357 expression by RT-PCR Quantitative Real-time technique.  $\beta$ -actin gene expression was  
1358 used as an internal control for data normalization, since previous tests showed no  
1359 variation among analyzed groups (data not shown). The sequences of primers used in  
1360 that step were built in the software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) and are  
1361 shown in Table 1.

### 2.2.3. Gene expressions

The gene expressions of CD3, CD4-2, RAG1 and IL-1 $\beta$  were quantitatively analyzed with Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR), with three repetitions per sample. The equipment used was 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) with the kit Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. The efficiency of the reactions was tested through qPCRs with serial dilutions of all primers (data not shown). The conditions of qPCR reactions were as follows: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C and 30 s at 60 °C. The expression of the genes was normalized using the housekeeping gene  $\beta$ -actin, which did not show significant differences through the samples.

### 2.2.4. Statistical analysis

A method of relative quantification was applied to analyze the gene expression of CD3, CD4-2, RAG1 and IL-1 $\beta$ , using the software REST (Pfaffl et al., 2002), with pair comparisons between the ages (3x10, 3x15, 3x30, 3x45, 3x60). The adopted alpha was 0.05 and results were expressed as median  $\pm$  standard error (SE).

## 3. Results

The mean length of newly-hatched larvae of *P. orbignyana* was  $1.780 \pm 0.069$  mm, reaching  $13.111 \pm 0.156$  mm at 60 dah. The metamorphosis comprised the period between 15 and 30 dah (Figure 1). With regard to the isolation of genes, sequences were obtained with 757, 533, 1,446 and 529 pb for CD3, CD4-2, IL-1 $\beta$  and RAG1 genes, respectively. Exons/introns were identified for the genes CD3, CD4-2 and IL-1 $\beta$ , whereas the sequence obtained for RAG1 corresponds only to the exon 3 of *P. olivaceus*. Comparisons made with the sequences obtained using the tool Blast from Genbank pointed to identity indices ranging from 81 to 96% with respect to the genomic sequences of *P. olivaceus*. Comparisons between exons/introns and sequences inferred from amino acids were also carried out. Additionally, conserved domains were identified for CD4-2, IL-1 $\beta$  1 and RAG1 (for details, see table 2).

1395 The expression of RAG1, CD3, CD4-2 and IL-1 $\beta$  genes during early  
1396 development was studied by RT-PCR and standardized using the housekeeping gene  $\beta$ -  
1397 actin. Figure 2 shows that constitutively low levels (basal levels) of the mRNAs were  
1398 detected during the early life stages of the Brazilian flounder, followed by an increase in  
1399 mRNA transcripts of all genes observed at different points, from 30 dah and onwards.

1400 RAG1 expression was clearly detected early in the development, though there  
1401 was no significant difference from 10 to 30 dah. At 45 dah, RAG-1 expression was  
1402 down-regulated, though it increased again and was significantly higher at 60 dah. CD3  
1403 and CD4-2 expression patterns were similar, though the levels of CD3 mRNA  
1404 transcripts were twice as high as CD4-2 mRNA levels. CD4-2 was down-regulated at  
1405 15 dah, however it showed a marked increase from 30 dah onwards. At 45 dah, the  
1406 levels of the cytokine IL-1 $\beta$  were significantly higher than all the other genes analyzed,  
1407 with a significant reduction at 60 dah.

1408

#### 1409 **4. Discussion**

1410

1411 In this study, the immune markers RAG1, CD3, CD4-2 and IL-1 $\beta$  in the early  
1412 stages of *P. orbignyanus* development were analyzed. The data obtained in this study  
1413 are similar to the expression patterns observed in higher vertebrates and other fish  
1414 species (Corripio-Miyar et al., 2007; Covello et al., 2013; Huttenhuis et al., 2005;  
1415 Øvergård et al., 2011). In this study, the expression levels of all genes were related to 3  
1416 dah mRNA levels, in order to avoid interference of maternally transferred material, as  
1417 the larvae hatch with a yolk-sac and their first feeding is only at 3 dah.

1418 According to Corripio-Miyar et al. (2007), the development of immune organs in  
1419 marine fish depends on a variety of factors, including water temperature, egg size and  
1420 length of the yolk sac period. Previous histological studies on the lymphoid organs of  
1421 the Brazilian flounder (data submitted for publication) showed that they appeared in the  
1422 following sequence: kidney (1 dah), thymus (5 dah) and spleen (10 dah). The thymus  
1423 was initially composed of lymphoblasts and thymocytes could be observed in the  
1424 thymus at 20-25 dah. A distinction between cortex and medulla was not clear in the  
1425 histological sections until 35 dah.

1426 The PCRs held from genomic DNA enabled the identification of exons and  
1427 introns in three of the four genes analyzed. Two introns and two exons were identified  
1428 for the gene CD3, with identities ranging from 73 to 96% when compared to the same

1429 regions of *P. olivaceus*. Although the identity of the inferred amino acid sequence is  
1430 relatively low (52%), and a conserved domain has not been identified, the distribution  
1431 and the identity between exons and introns suggest a correct identification of CD3 to *P.*  
1432 *orbignyianus*. For CD4-2, three introns and three exons were identified, although the  
1433 exon 3 corresponds to only one base. The identity indices ranged from 83 to 100%  
1434 when compared with *P. olivaceus*. In the same way as CD3, the amino acid sequence  
1435 deduced from CD4-2 showed a relatively low identity (65%). However, in this case, the  
1436 extracellular immunoglobulin-like domain, which is a characteristic of these co-  
1437 receptors, was identified. Three introns and four exons were identified for IL-1 $\beta$ , with  
1438 an identity ranging from 71 to 99% when compared to *P. olivaceus*. The sequence  
1439 inferred from amino acids showed 90% of identity with *P. olivaceus* IL-1 $\beta$ , with the  
1440 identification of the IL-1 domain, which constitute these mediators of the inflammatory  
1441 response. Unlike other genes isolated, the sequence obtained for RAG1 comprised only  
1442 the exon 3 in comparison with the homologous gene of *P. olivaceus*, though a high  
1443 identity was observed (96%). In this sense, the sequence inferred from amino acids had  
1444 97% of identity and allowed the identification of RAG-1 domain, characteristic of  
1445 recombination activating proteins.

1446 RAG1 expression was detected early in the development, and its levels remained  
1447 similar between 10 and 30 dah. This expression of RAG1 transcripts is related to the  
1448 histological detection of the first thymus anlage at 5 dah, showing that after that  
1449 moment, V(D)J recombination has already started. This result can be correlated to the  
1450 later increase in the expression of CD3 and CD4-2 transcripts at 30 dah, suggesting that  
1451 mature T lymphocytes are being developed at this stage of development. At 45 dah,  
1452 RAG1 expression decreased significantly, though it increased again and was  
1453 significantly higher at 60 dah. This decrease may be due to the end of metamorphosis or  
1454 to the weaning, when the live feed is replaced by dry feed. After this critical stage, the  
1455 levels of RAG1 mRNA increased significantly, which may be related to a greater  
1456 quantity of maturing lymphocytes, process that continues occurring after  
1457 metamorphosis. Mao et al. (2011) suggest that mass mortality can be related to  
1458 disorders in the process of V(D)J recombination, as RAG1 and 2 deficiency leads to  
1459 complete blockage of B and T cell development.

1460 Other studies with RAG1 in teleosts show a similar pattern, with some timing  
1461 variation in the expression levels. In zebrafish, a 10-fold increase in RAG1 mRNA  
1462 levels was reported in samples taken between 3 and 17 days post-fertilization (dpf),



1463 with a maximum reached at 21-28 dpf. There was then a gradual decrease in  
1464 expressions overtime until 105 dpf (Lam et al., 2004; Willett et al., 1997). RAG1 was  
1465 detected at 10 dah in gadoid haddock *Melanogrammus aeglefinus* (Corripio-Miyar et  
1466 al., 2007). These authors observed that RAG1 expression increased until B cells  
1467 matured and decreased with the increased levels of the expression of cell surface IgM.  
1468 Huttenhuis et al. (2005) detected RAG1 in the head kidney at 7 dpf, with an increase in  
1469 IgM levels at 28 dpf. IgM levels were not analyzed in this study, however it can be  
1470 suggested that the decrease in RAG1 levels at 45 dah might also be related to an  
1471 increase in IgM levels and maturity of B cells in the juvenile of *P. orbignyanus*.

1472 The expression patterns of CD3 and CD4-2 were similar in this study, though  
1473 the levels of CD3 were higher than CD4-2 levels. This result was also expected, as all T  
1474 lymphocytes harbor the CD3 co-receptor on their membranes, whereas only helper T  
1475 cells have CD4/CD4-2 receptors on their surfaces. Øvergård et al. (2011) reported that  
1476 CD3 chains expression increased at 45-49 dah, CD4-2 at 49 dah and CD4 at 73-80 dah.  
1477 Two CD4-like (CD4L) molecules have been identified in fish to date. One, CD4L-1, is  
1478 similar to that of mammals and birds, having four extracellular Ig domains. The other,  
1479 CD4L-2, shows homology with other vertebrate CD4 sequences but has two or three Ig  
1480 domains. Different fish species are in the possession of only two of these three  
1481 divergent forms of CD4, the classical CD4 (CD4L-1) and either the three-domain form  
1482 or the two-domain form (Dijkstra et al., 2006; Edholm et al., 2007; Laing et al., 2006;  
1483 Øvergård et al., 2010; Suetake et al., 2004). Expression analysis in tissues has suggested  
1484 that both CD4L-1 and CD4L-2 may function as helper T cells, although the function of  
1485 these two molecules is currently unknown, since only teleosts possess two CD4s (Toda  
1486 et al., 2011). In this study, we did not analyze CD4 molecules, so that further  
1487 investigations are needed to understand the difference in the expression of these two  
1488 molecules.

1489 The expression of the cytokine IL-1 $\beta$  at 45 dah was higher than all the other  
1490 genes analyzed. However, at 15 and 60 dah, IL-1 $\beta$  expression was down-regulated. This  
1491 decrease may also be related to the critical periods of the development of Brazilian  
1492 flounder. From 15 to 20 dah, some larvae became swollen and could not swim properly,  
1493 which led them to death. The cause of this problem is still unknown, though it may  
1494 indicate that the immune system of some larvae was debilitated due to an inadequate  
1495 nutrition or stressful conditions of cultivation. All the physical and chemical parameters  
1496 were desirable during the larviculture, following a well-defined protocol suggested by

1497 Sampaio et al. (2008). Thus, an inadequate nutrition is more likely to weaken the  
1498 immune system of the larvae and increase the expression of IL-1 $\beta$  due to its role in the  
1499 proinflammatory condition.

1500 Metamorphosis occurs from 15 to 30 dah and *P. orbignyana* larvae change their  
1501 pelagic habit to a benthic life, with eye migration to the left side of the body and  
1502 subsequent settlement. When the metamorphosis is finished, they are weaned, although  
1503 the adequate moment for the weaning has not yet been demonstrated (Bianchini et al.,  
1504 2010). Øvergård et al. (2011) analyzed 12 immune-related genes of the Atlantic halibut  
1505 *Hippoglossus hippoglossus*, and all of them declined between 108 and 128 dah (late  
1506 metamorphosis), increasing again after 144 dah. These authors suggested that the diet  
1507 with enriched *Artemia* sp. for 60 days could be responsible for this down-regulation of  
1508 the mRNA levels, as an increase in these levels is seen between 9 and 20 days after  
1509 weaning. Live feed with low levels of DHA/EPA, low digestibility of *Artemia* sp. and  
1510 changes in its fatty acid composition might influence the levels of mRNA of immune  
1511 markers, together with other factors acting during the metamorphosis of flatfish. In this  
1512 study, RAG1 and IL-1 $\beta$  mRNA levels also declined at 45 and 60 dah, respectively. This  
1513 decline could also be related to the nutritional conditions of *P. orbignyana* juveniles  
1514 after a long live feeding period and weaning.

1515 In this study, we analyzed the expression of immune markers in unfertilized  
1516 oocytes from two different females (data not shown). IL-1 $\beta$  and CD3 mRNAs were  
1517 detected in both samples, in a greater quantity than in all larvae and juveniles analyzed  
1518 in this study. However, when the samples were taken from the females, a small quantity  
1519 of blood escaped with the oocytes. For this reason, these results were not included in the  
1520 present work, but we wish to highlight the importance of maternally transferred  
1521 material, especially for Brazilian flounder larvae that hatch with a small size and their  
1522 systems are not fully functional until 3 dah. IL-1 $\beta$  was detected mainly in germ cells of  
1523 both the testicular and ovarian areas of the gonad during different stages of the  
1524 reproductive cycles of the gilthead seabream *Sparus aurata* (Chaves-Pozo et al., 2008).  
1525 This cytokine is important for an adequate innate and acquired immune response, and it  
1526 may be an important maternally transferred molecule for the larvae that hatch with  
1527 rudimentary systems, as the larvae of *P. orbignyana*. More studies will be carried out  
1528 in order to understand this process during the early stages of Brazilian flounder  
1529 development.

1530 Flatfish metamorphosis has been the subject of gene expression studies using  
1531 PCR-based methods. However, adequate and reliable reference genes for accurate  
1532 quantification needed to be validated. Due to the role of  $\beta$ -actin in cytoskeleton  
1533 structure, it is generally assumed that it is expressed at a constant level in different  
1534 tissues, cells or experimental treatments (Infante et al., 2008). In this study,  $\beta$ -actin was  
1535 used as a housekeeping gene, and its levels were constant throughout the period  
1536 analyzed while the other genes were down- or up-regulated, indicating changes in the  
1537 immune system.

1538 The investigation of immune system evolution, the development of vaccines,  
1539 and the selection of disease-resistant breeds are limited by the lack of sufficient  
1540 knowledge in fish immunity (Zhu et al., 2013). If fish are vaccinated as early as possible  
1541 in the cultivation, the need for antibacterial drugs is reduced and the survival is  
1542 increased (Covello et al., 2013). However, if they receive immune stimulation at an  
1543 early stage, before the immune system is fully developed, they are induced to tolerance,  
1544 with a decrease in the subsequent secondary response and efficacy of vaccination  
1545 (Øvergård et al., 2011).

1546 The immune system of the Brazilian flounder starts to develop around 5 dah  
1547 with the appearance of the thymus, with the subsequent expression of RAG1 proteins  
1548 that lead to the process of V(D)J recombination of the TCR on T cells. TCR, together  
1549 with CD3, form the TCR complex that is able to interact with MHC class II molecule,  
1550 process that is stabilized by the CD4 co-receptor on the surface of helper T cells. CD3  
1551 and CD4-2 mRNA levels are increased around 30 dah, suggesting that T lymphocytes,  
1552 especially helper T cells, are mature and able to recognize antigens presented by the  
1553 antigen presenting cells. An increase in the expression levels of the cytokine IL-1 $\beta$  at 30  
1554 dah also suggests that juveniles at this age can possibly respond to infection with an  
1555 inflammatory condition. The results in this study show the direction for more complete  
1556 studies with the expression of immune-related genes and the maternal transfer of  
1557 immunity to determine when the immune system of *P. orbignyanus* is fully mature and  
1558 when larvae and/or juvenile can be safely vaccinated to reduce the high mortalities  
1559 observed during the early stages of development.

1560

1561 **References**

1562

- 1563 Bianchini, A., Wasielesky Jr., W., Miranda-Filho, K.C., 1996. Toxicity of nitrogenous  
1564 compounds to juveniles of flatfish *Paralichthys orbignyanus*. Bull. of Environ.  
1565 Contam. Toxicol. 56, 453-459.
- 1566 Bianchini, A., Robaldo, R.B., Sampaio, L.A., 2010. Cultivo do linguado (*Paralichthys*  
1567 *orbignyanus*). In: Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds.), Espécies nativas para  
1568 piscicultura no Brasil. 2 ed. UFSM, Santa Maria.
- 1569 Cerqueira, V.R., 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes,  
1570 1839). Braz. Arch. Biol. and Technol. 48(3), 459-465.
- 1571 Chantanachookhin, C., Seikai, T., Tanaka, M., 1991. Comparative study of the  
1572 ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. Aquac. 99, 143-  
1573 155.
- 1574 Chaves-Pozo, E., Liarte, S., Fernández-Alacid, L., Abellán, E., Meseguer, J., Mulero,  
1575 V., García-Ayala, A., 2008. Pattern of expression of immune-relevant genes in the  
1576 gonad of a teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Mol. Immunol. 45,  
1577 2998-3011.
- 1578 Corripio-Miyar, Y., Bird, S., Treasurer, J.W., Secombes, C.J., 2007. RAG-1 and IgM  
1579 genes, markers for early development of the immune system in the gadoid  
1580 haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. Fish Shellfish Immunol. 23, 71-85.
- 1581 Covello, J.M., Bird, S., Morrison, R.N., Bridle, A.R., Battaglione, S.C., Secombes, C.J.,  
1582 Nowak, B.F., 2013. Isolation of RAG-1 and IgM transcripts from the striped  
1583 trumpeter (*Latris lineata*), and their expression as markers for developmental of the  
1584 adaptive immune response. Fish Shellfish Immunol. 34, 778-788.
- 1585 Dijkstra, J.M., Somamoto, T., Moore, L., Hordvik, I., Ototake, M., Fischer, U., 2006.  
1586 Identification and characterization of a second CD4-like gene in teleost fish. Mol.  
1587 Immunol. 43, 410-419.
- 1588 Edholm, E.S., Stafford, J.L., Quiniou, S.M., Waldbieser, G., Miller, N.W., Bengten, E.,  
1589 Wilson, M., 2007. Channel catfish, *Ictalurus punctatus*, CD4-like molecules. Dev.  
1590 Comp. Immunol. 17, 523-554.
- 1591 Figueiredo, J. L., Menezes, N. A., 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do  
1592 Brasil. Volume VI. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo.
- 1593 Fischer, U., Koppang, E.O., Nakanishi, T., 2013. Teleost T and NK cell immunity. Fish  
1594 Shellfish Immunol. 35, 197-206.

- 1595 Fujiki, K., Shin, D.-H., Nakao, M., Yano, T., 2000. Molecular cloning and expression  
1596 analysis of carp (*Cyprinus carpio*) interleukin-1 $\beta$ , high affinity immunoglobulin E  
1597 Fc receptor  $\gamma$  subunit and serum amyloid A. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 229-242.
- 1598 Huttenhuis, H.B.T., Huising, M.O., Van der Meulen, T., Van Oosterhoud, C.N.,  
1599 Sánchez, N.A., Taverne-Thiele, A.J., Stroband, H.W.J., Rombout, J.H.W.M.,  
1600 2005. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic tissues during the  
1601 development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp. Immunol.* 29, 1033-  
1602 1047.
- 1603 Infante, C., Matsuoka, M.P., Asensio, E., Cañavate, J.P., Reith, M., Manchado, M.,  
1604 2008. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from  
1605 flatfish using real-time PCR. *BMC Mol. Biol.* 9, 28.
- 1606 Josefsson, S., Tatner, M.F., 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream  
1607 (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 3, 35-49.
- 1608 Laing, K.J., Zou, J.J., Purcell, M.K., Phillips, R., Secombes, C.J., Hansen, J.D., 2006.  
1609 Evolution of the CD4 family: teleost fish possess two divergent forms of CD4 in  
1610 addition to lymphocyte activation gene-3. *J. Immunol.* 177, 3939-3951.
- 1611 Lam, S.H., Chua, H.L., Gong, Z., Lam, T.J., Sin, Y.M., 2004. Development and  
1612 maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression  
1613 profiling, in situ hybridization and immunological study. *Dev. Comp. Immunol.*  
1614 28, 9-28.
- 1615 Lu, X.-J., Chen, J., He, Y.-Q., Shi, Y.-H., 2013. Molecular characterization of an IL-1 $\beta$   
1616 gene from ayu, *Plecoglossus altivelus*. *Fish Shellfish Immunol.* 34, 1253-1259.
- 1617 Mao, M.-G., Lei, J.-L., Alex, P.-M., Hong, W.-S., Wang, K.-J., 2012. Characterization  
1618 of RAG1 and IgM (mu chain) marking development of the immune system in  
1619 red-spotted grouper (*Epinephelus akaara*). *Fish Shellfish Immunol.* 33, 725-735.
- 1620 Øvergård, A.-C., Hordvik, I., Nerland, A.H., Eikeland, G., Patel, S., 2009. Cloning and  
1621 expression analysis of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) CD3 genes.  
1622 *Fish Shellfish Immunol.* 27, 707-713.
- 1623 Øvergård, A.-C., Fiksdal, I.U., Nerland, A.H., Patel, S., 2011. Expression of T-cell  
1624 markers during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ontogenesis.  
1625 *Dev. Comp. Immunol.* 35, 203-213.
- 1626 Padrós, F., Crespo, S., 1996. Ontogeny of lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus*  
1627 *maximus*: a light and electron microscope study. *Aquac.* 144, 1-16.

- 1628 Park, C.I., Hirono, I., Enomoto, J., Nam, B.-H., Aoki, T., 2001. Cloning of Japanese  
1629 flounder *Paralichthys olivaceus* CD3 cDNA and gene, and analysis of its  
1630 expression. *Immunogen.* 53, 130-135.
- 1631 Patel, S., Øvergård, A.-C., Nerland, A.H., 2009. A CD4 homologue in Atlantic halibut  
1632 (*Hippoglossus hippoglossus*): molecular cloning and characterization. *Fish*  
1633 *Shellfish Immunol.* 26, 377-384.
- 1634 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool  
1635 (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression  
1636 results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30(9), e36.
- 1637 Randelli, E., Buonocore, F., Scapigliati, G., 2008. Cell markers and determinants in fish  
1638 immunology. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 326-340.
- 1639 Rocha, A.F., Carvalho, C.V.A., Sampaio, L.A., 2008. Produção de juvenis do linguado  
1640 *Paralichthys orbignyanus*: efeito da duração do período de co-alimentação  
1641 durante o desmame. *Ciênc. Rural* 38(8), 2334-2338.
- 1642 Romano, N., Fanelli, M., Papa, G.M., Scapigliati, G., Mastrolia, L., 1999. Histological  
1643 and cytological studies on the developing thymus of sharpsnout seabream,  
1644 *Diplodus puntazzo*. *J. Anat.* 194, 39-50.
- 1645 Sampaio, L.A., Bianchini, A., Cerqueira, V.R., 2001. Growth of juvenile Brazilian  
1646 flounder, *Paralichthys orbignyanus*, cultured at different salinities. *J. Appl.*  
1647 *Aquac.* 11, 67-75.
- 1648 Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of  
1649 the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 269,  
1650 187-196.
- 1651 Sampaio, L.A., Freitas, L.S., Okamoto, M.H., Louzada, L.R., Rodrigues, R.V., Robaldo,  
1652 R.B., 2007. Effects of salinity on Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*  
1653 from fertilization to juvenile settlement. *Aquac.* 262, 340-346.
- 1654 Sampaio, L.A., Robaldo, R.B., Bianchini, A., 2008. Hormone-induced ovulation,  
1655 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys*  
1656 *orbignyanus* (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.*, 39, 712-717.
- 1657 Schröder, M.B., Villena, A.J., Jorgensen, T.O., 1998. Ontogeny of lymphoid organs and  
1658 immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Dev.*  
1659 *Comp. Immunol.* 22(5-6), 507-517.
- 1660 Secombes, C.J., Wang, T., Bird, S., 2011. The interleukins of fish. *Dev. Comp.*  
1661 *Immunol.* 35, 1336-1345.

- 1662 Suetake, H., Araki, K., Suzuki, Y., 2004. Cloning, expression and characterization of  
1663 fugu CD4, the first ectothermic animal CD4. *Immunogen.* 56, 368-374.
- 1664 Sun, X.-F., Shang, N., Hu, W., Wang, Y.-P., Guo, Q.-L., 2007. Molecular  
1665 characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) CD8 $\beta$  and CD4-like genes. *Fish*  
1666 *Shellfish Immunol.* 23, 1242-1255.
- 1667 Toda, H., Saito, Y., Koike, T., Takizawa, F., Araki, K., Yabu, T., Somamoto, T.,  
1668 Suetake, H., Suzuki, Y., Ototake, M., Moritomo, T., Nakanishi, T., 2011.  
1669 Conservation of characteristics and functions of CD4 positive lymphocytes in a  
1670 teleost fish. *Dev. Comp. Immunol.* 35, 650-660.
- 1671 Wasielesky Jr., W., Bianchini, A., Santos, M.H., Poersch, L.H., 1997. Tolerance of  
1672 juvenile flatfish *Paralichthys orbignyanus* to acid stress. *J. World Aquac. Soc.*  
1673 28, 202-204.
- 1674 Wasielesky Jr., W., Miranda-Filho, K., Bianchini, A., 1998. Tolerancia a la temperatura  
1675 de juveniles de lenguado *Paralichthys orbignyanus*. *Frente Marít.* 17, 43-48.
- 1676 Watanabe, T., Kitajima, C., Fujita, S., 1983. Nutritional values of live food organisms  
1677 used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquac.* 34, 115-143.
- 1678 Willett, C.E., Zapata, A.G., Hopkins, N., Steiner, L.A., 1997. Expression of zebrafish  
1679 rag genes during early development identifies the thymus. *Dev. Biol.* 182, 331-  
1680 341.
- 1681 Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-De Frías, C., Cortés, A., 2006. Ontogeny of  
1682 the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 126-136.
- 1683 Zhu, L., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L., Shao, J.-Z., 2013. Advances in research of fish  
1684 immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive  
1685 immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 39-62.
- 1686

1687 Table 1. Primer sequences for genes isolation and real-time PCR (qPCR).

Degenerate primers for gene isolation

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Expected amplicon size
CD3	TGCTGCTGCTTTGGACRCTGCCA	TGGACCAGCCTGAGACGCGAY	900 pb
CD4-2	GCTGGGTGCACTCTCTGCTGC	GCCCACA KCCACCAGYCGAGCK	2,000 pb
RAG1	YATGGGMGAYGTCAGYGAGAAGCACGGTGGGCTGGGTYTCCAWGAAGGGY		600 pb
IL-1 $\beta$	YGTGGTCAACCTCATCATCGCCA	TACCAGTYGGGGAAGCGGGCS	1,800 pb

Specific primers for qPCR

Gene	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	Genbank accession
CD3	CCTGTGAAA ACTGCATCGAGCTCAACA	CCGCATCTCCAACAATGAGGCCG	KJ551376
CD4-2	TACTGTTCAGTGGACGGGGCCAG	TCACACTGCCATGTTCCCGCATC	KJ551377
RAG1	TCCGCTTCCACTTCAGAGGCACA	TGAGGCCTCTAGGCCCTCCATCT	KJ551379
IL-1 $\beta$	TCCACCTATGTGCACCCTTCCCC	CCATGTGGCACGACAGGAAGAGG	KJ551378
$\beta$ -actin	CCAAGCTGTGCTGTCCCTGTA	ACACCATCACCGGAGTCCAT	EU542580

1688

1689

1690

1691

1692

1693

1694



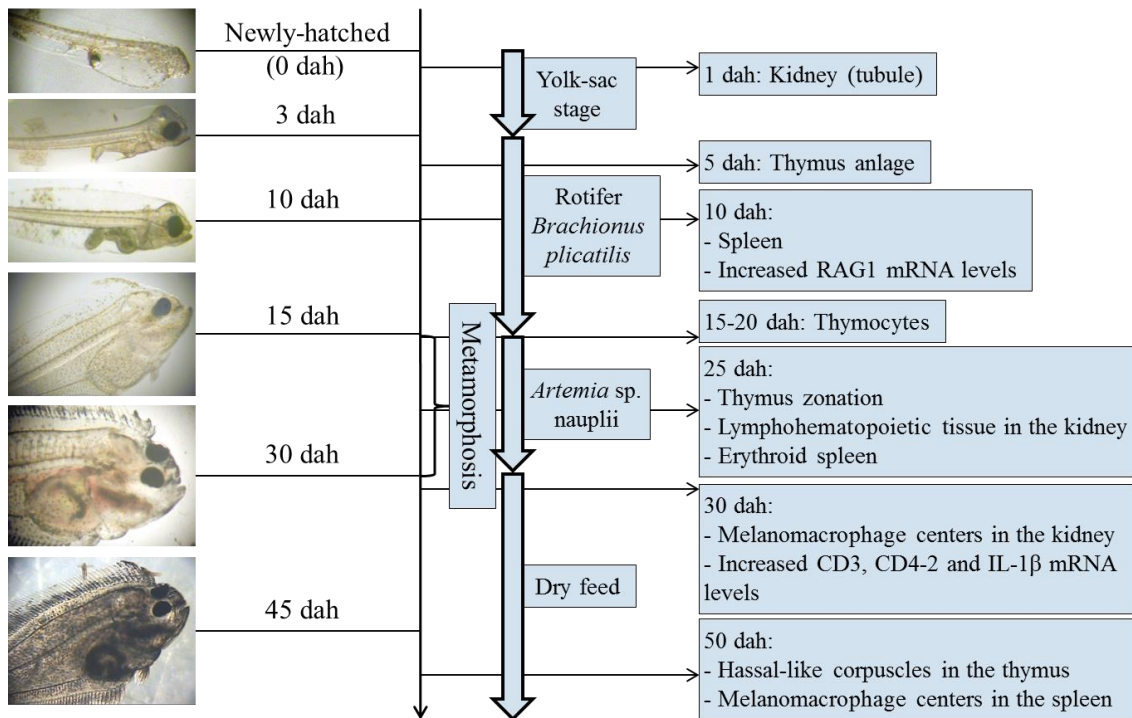
1695 Table 2. Blast comparisons of obtained gene sequences from *Paralichthys orbignyanus*.

1696 Id. = identity in comparison to *Paralichthys olivaceus*.

<b>Blast comparison to <i>P. olivaceus</i></b>						
<b>Gene</b>	<b>Sequence (nt)</b>	<b>Complete Id./cover</b>	<b>Intron (position) Id./cover</b>	<b>Exon (position) Id./cover</b>	<b>Amino acid Id./cover</b>	<b>Domain</b>
CD3	757	81/100	I1 (1-272): 87/94	E2 (273-485): 73/75	93 aa	ND*
			I2 (486-687): 89/94	E3 (688-757): 96/100	52/100	
CD4- 2	533	85/100	I3 (1-33): 100/69	E4 (34-267): 83/100	99 aa	IG-like
			I4 (268-355): 90/100	E5 (356-421): 86/100	65/100	
			I5 (422-532): 84/100	E6 (533)		
IL-1 $\beta$	1,446	86/97		E1 (1-67): 99/100		IL1
			I1 (68-854): 81/93	E2 (855-1019): 96/100	129 aa	
			I2 (1029-1189): 86/100	E3 (1190-1323): 92/100	90/99	
			I3 (1324-1425): 92/100	E4 (1426-1446): 71/100		
RAG1	529	96/99		E3 (1-529): 96/99	175 aa 97/100	RAG1

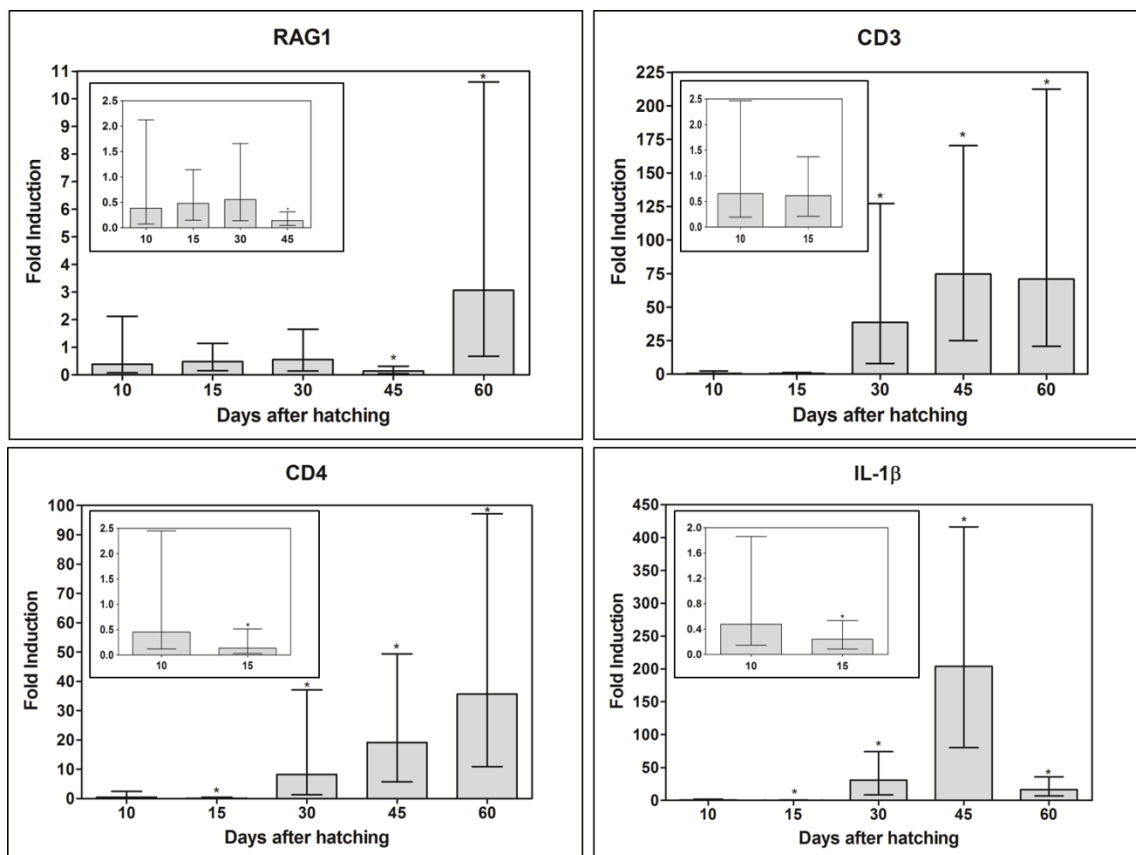
1697 \*ND = not detected.

1698



1699

1700 Figure 1. Summary of the major events during Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*,  
 1701 ontogenesis, from newly-hatched larvae to 50 days after hatching (dah), such as metamorphosis  
 1702 period, feeding habits, histological development of the immune system (unpublished data) and  
 1703 expression of the immune-related genes analyzed in this study.



1704

1705 Figure 2. Relative expression of RAG1, CD3, CD4-2 and IL-1 $\beta$  during the development of the  
1706 Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*, from 10 to 60 days after hatching. The  
1707 expressions are related to 3 dah using  $\beta$ -actin as internal reference gene.

1708

1709

1710

1711

1712

1713

1714

1715

1716

1717

1718

1719

1720

1721

1722

1723

1724

1725

1726

1727

### CAPÍTULO 3

1728

1729

1730

1731

1732

1733

1734

1735

1736

1737

1738 **Morphological characterization of blood cells in adults of the Brazilian flounder**

1739 *Paralichthys orbignyanus*

1740

1741 Emeline Pereira Gusmão, Luís André Sampaio, Luis Alberto Romano

1742

1743

1744

1745

1746

1747 Artigo submetido a The Anatomical Record

1748

1749

1750

1751

1752

1753

1754

1755

1756

1757 **Morphological characterization of blood cells in the Brazilian flounder**

1758 *Paralichthys orbignyanus*

1759

1760 **Abstract**

1761

1762 Several studies have been conducted on the biology and viability of the Brazilian  
1763 flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) for aquaculture activities in  
1764 southern Brazil. Well-defined protocols for reproduction and larviculture in captivity  
1765 have already been established. However, data still lack about necessary basic biological  
1766 knowledge, such as hematological aspects of this species, which can help improve its  
1767 cultivation and resistance against diseases. This study aimed to obtain preliminary  
1768 information about the morphological features of the blood of *P. orbignyanus* adults. Fish  
1769 were obtained from a recirculating water system and anesthetized to collect peripheral  
1770 blood through puncture of caudal vein. Blood smears were prepared and stained with  
1771 May-Grünwald-Giemsa method. The blood of Brazilian flounder follows the

1772 hematological pattern of other vertebrates, with the following main cellular components:  
1773 erythrocytes, leucocytes and thrombocytes, with occasional immature stages.  
1774 Erythrocytes were the dominant cell type in the blood ( $5.14 \times 10^6/\text{mm}^3$ ), whereas  
1775 lymphocytes are the most common white cells of the blood (48.27%). The number of  
1776 leucocytes in this study was  $3.55 \times 10^3/\text{mm}^3$ , and granulocytes corresponded to 50.53%  
1777 of the white cells. Mature monocytes were not observed in the peripheral blood of *P.*  
1778 *orbignyanus*. Thrombocytes were the smallest cells of the blood. More studies on the  
1779 hematological parameters need to be developed to help establish reference values for this  
1780 candidate species to aquaculture.

1781

1782 **Keywords:** *Paralichthys orbignyanus*; blood cells; morphology

1783

## 1784 **1. Introduction**

1785

1786 The Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) belongs  
1787 to the family Paralichthyidae (Pleuronectiformes) and is distributed from Rio de Janeiro,  
1788 Brazil, to Mar del Plata, Argentina (Figueiredo and Menezes, 2000) and is the largest  
1789 flatfish species in southern Brazil. Several studies have been conducted on the biology  
1790 and the viability of the species for aquaculture, due to its commercial value and potential  
1791 for cultivation. Well-defined protocols for reproduction and larviculture in captivity have  
1792 been established (Cerqueira, 2005; Bianchini et al., 2010). This species shows many  
1793 biological aspects that are favorable for aquaculture: it is a euryhaline fish, is tolerant to  
1794 high densities, accepts inert feed well. Data are still lacking that connect necessary basic  
1795 biological knowledge to its ideal culture, as no studies were found related to  
1796 hematological aspects.

1797 The introduction of a new species to aquaculture can be successful if there is a  
1798 detailed knowledge of the physiology of the species, among other things (Valdebenito et  
1799 al., 2011). Fish possess a circulatory system filled with blood, a feature shared by all  
1800 vertebrates which provides a homeostatically controlled internal environment (Fänge,  
1801 1994). Knowledge of hematological and immunological characteristics of the fish can  
1802 provide useful information and contribute to the evaluation of resistance against  
1803 infectious diseases and assessment of the physiological status of the fish (Fazio et al.,  
1804 2013). Blood indices provide reliable information on metabolic disorders, deficiencies  
1805 and chronic stress status before they are present in a clinical setting (Satheeshkumar et

1806 al., 2011). However, the literature on the hematology of marine and estuarine species is  
1807 still scarce (Seriani et al., 2010). This knowledge of the hematological characteristics of  
1808 a cultured fish species is an important tool for aquaculture. Hematological tests are easily  
1809 available and a sensible tool to evaluate the status of an organism, although they are not  
1810 very specific. A non-lethal and rapid method to monitor the health status of fish in relation  
1811 to environmental conditions is a request for successful farming (Fazio et al., 2013).

1812 This study aimed to obtain preliminary information about the hematology of *P.*  
1813 *orbignyianus*, describing the morphological features of the blood cells under the light  
1814 microscopy. This might provide useful information for other researchers to diagnose and  
1815 monitor disease in this species, as well as the use of biomarkers associated with stressor  
1816 agents.

1817

## 1818 **2. Materials and Methods**

1819

1820 Fish were maintained in a recirculating water system comprised of 3 tanks (300 L  
1821 each), a circulation pump (1/3 HP), sand filter, UV sterilizer, protein skimmer for  
1822 processing/removal of dissolved organics and small suspended solids, and a diffusion  
1823 aeration/degassing system. The water system provided the maximum of 10% water  
1824 exchange each day and with the biofilter maintain toxic nitrogen compounds in low  
1825 concentrations. Density was maintained at 10 fish per tank with a 14h Light:10h Dark  
1826 photoperiod. Fish were fed 2 times a day with commercial diet (CP: 50%).

1827 Nine female fish ( $238.45 \pm 0.91$  g;  $11.95 \pm 1.7$  cm) were randomly collected and  
1828 anesthetized with 50 ppm benzocaine. Peripheral blood was collected by puncture of  
1829 caudal vein with a 26-gauge needle coated with heparin and attached to a 1.0 mL syringe.  
1830 Blood smears (two per fish) were air dried and stained (May-Grünwald-Giemsa method).  
1831 Blood cells were examined with a compound light microscope Zeiss Primo Star  
1832 connected to a AxioCam ERc 5s (Zeiss) digital camera and characterized according to  
1833 Conroy (1998). Cells were counted with a SYSMEX SF 3000 hematological analyzer  
1834 following Rodero et al. (2003). Images were analysed with AxioVision 4.8.2.0 software  
1835 (Carl Weiss MicroImaging GmbH).

1836

## 1837 **3. Results**

1838

1839 The following cell types were identified in the peripheral blood of Brazilian  
1840 flounder *P. orbignyanus* adults: erythrocytes, granulocytes, lymphocytes, thrombocytes  
1841 and blast cells (Fig. 1). The types of cells and their sizes are shown in Table 1.

1842

### 1843 **3.1. Erythrocytic series**

1844

1845 Proerythroblasts: Proerythroblasts are the earliest erythrocyte precursors,  
1846 preceding the polychromatophilic erythroblasts (Fig. 2D, 2E). These blast cells are  
1847 spherical and have a large round nucleus with prominent chromatin material and frequent  
1848 nucleoli.

1849 Polychromatophilic erythroblasts: These cells are round shaped with a central  
1850 nucleus characterized by compact and basophilic chromatin.

1851 Erythrocytes: Erythrocytes are elliptical and biconvex, and the central nucleus is  
1852 also elliptical and surrounded by a slightly eosinophilic homogeneous cytoplasm (Fig.  
1853 2A). These nucleated elements are the fully matured of the erythrocytic series. The  
1854 number of erythrocytes in the peripheral blood of *P. orbignyanus* was  $5.14 \times 10^6/\text{mm}^3$   
1855 and the average size of these cells was  $14.20 \pm 1.77 \mu\text{m}$ , the largest mature cells of the  
1856 blood.

1857

### 1858 **3.2. Leucocytes**

1859

#### 1860 **3.2.1. Granulocytic series**

1861

1862 In this study, mature granulocytes (polymorphonuclear) were basophilic and  
1863 eosinophilic granular cells, observed as large and commonly irregular cells. Their nucleus  
1864 can be horseshoe-shaped, eccentric, round and sometimes bilobed and their cytoplasm is  
1865 full of granules (Fig. 2C). The mean diameter of these cells in *P. orbignyanus* was  $11.23$   
1866  $\pm 3.61 \mu\text{m}$ .

1867 Other cell types of the granulocytic series could be observed: granuloblasts,  
1868 progranulocytes and metagranulocytes, in order of development (Fig. 2E, 2F, 2G). A  
1869 reduction in the diameter of these cells according to their developmental stage was  
1870 observed. The granuloblast is spheroid to ovoid, with a central to slightly eccentric  
1871 nucleus and an average diameter of  $23.47 \pm 1.84 \mu\text{m}$ . Progranulocytes correspond to

1872 mammalian promyelocytes and are spherical to ovoid cells, with an average diameter of  
1873  $11.71 \pm 1.90 \mu\text{m}$ . Metagranulocytes presented an average diameter of  $14.28 \pm 2.13 \mu\text{m}$ .

1874

### 1875 **3.2.2. Agranulocytic series**

1876

1877 Lymphocytes: These are basophilic round cells that possess a large and spherical  
1878 central nucleus occupying most of the cell volume. In this study, lymphocytes had an  
1879 average diameter of  $10.50 \pm 2.69 \mu\text{m}$  (Fig. 2B). Lymphoblasts, similar to the  
1880 proerythroblasts, were also observed in the peripheral blood of *P. orbignyanus*, with an  
1881 average diameter of  $15.02 \pm 1.72 \mu\text{m}$ .

1882 Monocytes: Mature monocytes were not observed in this study. However,  
1883 monoblasts, present only in a few samples, and promonocytes, which were the largest  
1884 cells observed in the blood of *P. orbignyanus*, could be observed, with an average  
1885 diameter of  $14.81 \pm 1.63 \mu\text{m}$  and  $22.95 \pm 1.29 \mu\text{m}$ , respectively.

1886

### 1887 **3.3. Thrombocytic series**

1888

1889 Thrombocytes: These cells were present in different morphologies, normally oval  
1890 or spindle-shaped cells with a central nucleus. They appear as single cells but also occur  
1891 in clusters due to clotting of blood samples. The mean diameter of these cells was  $4.84 \pm$   
1892  $0.97 \mu\text{m}$ , and they were the smallest cells present in the blood of *P. orbignyanus*.

1893

## 1894 **4. Discussion**

1895

1896 Fish blood is a specialized circulating tissue composed of cells suspended in a  
1897 fluid intercellular substance (plasma), and it is also a mirror that reflects all the vital  
1898 processes in the organisms. The main lines of blood cells in fishes are erythrocytes (red  
1899 blood cells – RBC), leucocytes (white blood cells – WBC) and thrombocytes (Ranzani-  
1900 Paiva et al., 2003; Genten et al., 2009). The blood of Brazilian flounder adults basically  
1901 follows the hematological pattern of other vertebrates. The main cellular components of  
1902 the peripheral blood of *P. orbignyanus* consist of erythrocytes, lymphocytes, granulocytes,  
1903 monocytes and thrombocytes. Occasionally, immature stages are also observed, though  
1904 they do not necessarily indicate a blood dysfunction (Watson et al., 1963).



1905 Erythrocytes are the dominant cell type in the blood of the vast majority of fish  
1906 species, constituting 98-99% of the blood cells. These cells are nucleated and their sizes  
1907 may vary with the amount of nuclear DNA or the genome size. The function of the red  
1908 cells is to transport respiratory gases, and their concentration is related to the habitat and  
1909 locomotion type of the different fish species (Fänge, 1994; Vázquez and Guerrero, 2007).

1910 The morphology of mature erythrocytes observed in *P. orbignyanus* is coincident  
1911 with the morphological descriptions reported for teleosts by different authors. However,  
1912 the erythrocytes in the peripheral blood of *P. orbignyanus* were larger than erythrocytes  
1913 of most fish species reported in the literature (Watson et al., 1963; Hartman and Lessler,  
1914 1964; Vázquez and Guerrero, 2007; Tavares-Dias et al., 2008; Nikolov and Boyadzieva-  
1915 Doichinova, 2010; Valdebenito et al., 2011). Hartman and Lessler (1964) reported larger  
1916 erythrocytes than those in *P. orbignyanus*, in the teleost species *Opsanus tau* ( $14.9 \pm 2$   
1917  $\mu\text{m}$ ).

1918 The erythrocyte is the most important carrier of oxygen and carbon dioxide. The  
1919 size and shape of RBC indicate the surface available for the exchange of these gases in  
1920 respiratory functions (Hartman and Lessler 1964). A small cell has a greater rate of  
1921 exchange than a large cell. The surface/volume ratio influences all the processes involving  
1922 plasma membrane (Tavares-Dias et al. 2008). One can assume that the diameter of the  
1923 smallest capillaries must be no less than the smaller diameter of the erythrocyte, as stated  
1924 by Hartman and Lessler (1964). Mammal erythrocytes are extremely deformable and pass  
1925 easily through the smallest blood capillaries by folding upon themselves, which is  
1926 allowed because they lack nucleus. Fish erythrocytes, however, are nucleated cells and  
1927 probably lack this capacity of deforming themselves to pass through the capillaries. Thus,  
1928 adults of *P. orbignyanus* have a less active behavior in comparison with other teleost fish  
1929 since the large erythrocytes are less efficient for the transport of oxygen. Lower oxygen  
1930 carrying capacity presumably reflect a greater adaptation to survive in environments with  
1931 low levels of oxygen, as well as a higher metabolic activity.

1932 The number of erythrocytes in *P. orbignyanus* is higher than in other species of  
1933 teleost fish ( $5.14 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). This happens probably to improve their performance by  
1934 increasing the number of erythrocytes and possibly the concentration of hemoglobine in  
1935 the peripheral blood, as recorded by Tavares-Dias et al. (2008) for the omnivore teleost  
1936 fish *Prochilodus lineatus*. High erythrocyte number has been associated with fast  
1937 movement, predaceous nature and high activity in environments such as intensive estuary  
1938 systems (Satheeshkumar et al., 2011).

1939 In adults of *P. orbignyanus* the elements of the erythrocyte line corresponded to  
1940 proerythroblasts, polychromatophilic erythroblasts and erythrocytes. These cells could  
1941 participate in the transport of oxygen in a less efficient way, as immature erythrocytes are  
1942 released into the blood undergoing their final maturation within the circulation and the  
1943 synthesis of hemoglobin takes place during the maturation of the erythrocyte cell (Fänge,  
1944 1994; Valdebenito et al., 2011). Primary red blood cells indices may be highly variable  
1945 and dependent on the fish species. Previous studies have also correlated the number of  
1946 erythrocytes to weight, sex, age, season, feeding behaviour and habitat (Santos et al.,  
1947 2009; Satheeshkumar et al., 2011; Valdebenito et al., 2011; Fazio et al., 2013).

1948 It is known that the classification and nomenclature of leucocytes may be  
1949 controversial and confusing due to their staining properties under light microscopy and  
1950 methods used in mammalian hematology that do not give good results when applied to  
1951 fish blood smears (Genten et al., 2009). Two types of fish leucocytes can be distinguished  
1952 in peripheral blood: agranulocytes, with no granules (lysosomes) in the cytoplasm and  
1953 unlobed nucleus; and granulocytes, which contain granules and lobed nucleus. Two types  
1954 of agranulocytes can be distinguished: lymphocytes and monocytes (Genten et al., 2009).

1955 In this study, lymphocytes, granulocytes and blast cells could be distinguished.  
1956 The number of leucocytes in this study was  $3.55 \times 10^3/\text{mm}^3$ , which is less than the number  
1957 reported for other teleost species in the literature (Watson et al., 1963; Kavamoto et al.,  
1958 1983; Ueda et al., 1997; Vázquez and Guerrero, 2007; Tavares-Dias et al., 2008; Filiciotto  
1959 et al., 2012; Fazio et al., 2013). However, it is known that the majority of leucocytes occur  
1960 in the tissues rather than in the blood, i.e., dermis, intestinal tissue, gills, natatory bladder,  
1961 hematopoietic tissue, nasal epithelium, heart and inflamed tissue (Fänge, 1994;  
1962 Valdebenito et al., 2011).

1963 The differential counts of leucocytes showed that granulocytes correspond to  
1964 50.53% of the white blood cells, though lymphocytes are the most common white cells  
1965 of the blood (48.27%). Lymphocytes usually constitute approximately half of the  
1966 leucocytes in the blood of teleosts. Less lymphocytes were observed in the peripheral  
1967 blood of *P. orbignyanus* when compared to the other species studied, except for  
1968 *Oreochromis niloticus* (43.42%) (Ueda et al., 1997) and *Brycon amazonicus* (38.9%)  
1969 (Tavares-Dias et al., 2008). However, these cells are also larger than lymphocytes of other  
1970 fish reported in the literature (Watson et al., 1963; Vázquez and Guerrero, 2007; Tavares-  
1971 Dias et al., 2008; Valdebenito et al., 2011).

1972            Monocytes constitute a minor fraction of the leucocytes and some authors have  
1973 been unable to find them in their studies and even deny their existence on fish blood  
1974 (Watson et al., 1964; Ueda et al., 2001; Vázquez and Guerrero, 2007; Genten et al., 2009).  
1975 These cells are phagocytic and, comparably to the monocytes of higher vertebrates, they  
1976 may belong to the same cell line as the macrophages of the tissues (Fänge, 1994; Esteban  
1977 et al., 2000). Mature monocytes were not observed in the peripheral blood of *P.*  
1978 *orbignyanus*. However, monoblasts and promonocytes were present in the blood,  
1979 corresponding to 1.20% of the leucocytes. Monocytes frequently correspond to the largest  
1980 blood cells, and promonocytes were the largest cells in the peripheral blood of *P.*  
1981 *orbignyanus*. Valdebenito et al. (2011) reported that the concentration of monocytes in  
1982 the blood tissue may be depleted by bacterial diseases such as BKD and vibriosis and by  
1983 consumption of diets without vitamin E, though these diseases were not observed in the  
1984 fish used for this study.

1985            Granulocytes may be of three types in fishes: neutrophils, eosinophils and  
1986 basophils. A major part of the granulocytes of teleosts resemble mammalian  
1987 polymorphonucleated or neutrophilic granulocytes (Fänge, 1994). Most authors report  
1988 that neutrophils are the most frequent type of granulocyte, whereas the occurrence of  
1989 eosinophils, and in particular basophils, is often questioned (Vázquez and Guerrero,  
1990 2007). In this study, granulocytes were the larger mature cells in the blood after  
1991 erythrocytes, and larger than granulocytes from other species of teleosts the mean size of  
1992 all granulocyte types was only smaller than erythrocytes, and larger than granulocytes  
1993 from other species of teleost fishes (Watson et al., 1963; Vázquez and Guerrero, 2007;  
1994 Tavares-Dias et al., 2008; Valdebenito et al., 2011), except for *Carassius auratus*  
1995 (Watson et al., 1963). Granulocytes and monocytes are phagocytically active and  
1996 participate in cellular defence against microbes and parasites (Fänge, 1994).

1997            Thrombocytes have been described as the most abundant cells after erythrocytes,  
1998 though their number can be extremely variable due to clotting. Some authors included  
1999 thrombocytes within leucocytes, however this is a different lineage of blood cell that takes  
2000 part in blood clotting and may form a protective barrier against foreign agents and even  
2001 remove circulating cell fragments by phagocytosis (Genten et al., 2009). Some authors  
2002 reported that it is difficult to distinguish thrombocytes from lymphocytes (Tavares-Dias,  
2003 2006). However, in this study, the thrombocytes were the smallest cells of the blood and  
2004 much smaller than lymphocytes and thrombocytes of other fish species (Watson et al.,  
2005 1963; Vázquez and Guerrero, 2007; Tavares-Dias et al., 2008; Valdebenito et al., 2011).

2006 It is known that the study of hematological parameters and morphological  
2007 characteristics of fish blood cells is important for aquaculture as a tool to monitor  
2008 physiological and pathological changes in fishes. However, Vázquez and Guerrero (2007)  
2009 cite that blood sampling, laboratory techniques, seasonal variations, size, genetic  
2010 properties, sex, population density, lack of food supply, environmental stress and  
2011 transportation can affect hematological data. Such factors make it difficult to define  
2012 normal values independent of variations in the environment (Lie et al., 1990). Care must  
2013 be taken when establishing reference intervals and making comparisons, which is difficult  
2014 also due to the numerous problems derived from the nomenclature referred to higher  
2015 vertebrates and applied to fish (Esteban et al., 2000). The ranges of normal values of the  
2016 key biochemical parameters are still undefined for different species in different  
2017 aquaculture conditions (Satheeshkumar et al., 2011). Moreover, Satheeshkumar et al.  
2018 (2012) stated that there are no “normal” values because of the responsiveness of the blood  
2019 vascular system to external stimuli.

2020 Hematological examinations must establish the baseline data for the fish in a  
2021 specific situation and monitor the population for changes in the hemogram. Those authors  
2022 also suggest the introduction of regular checks of the blood profiles of fish, as this  
2023 procedures do not need to kill the fish and can be applied repeatedly to the same  
2024 individuals. Fazio et al. (2013) reported no differences between haematological  
2025 parameters evaluated with manual and automatic methods. For these reasons, more  
2026 studies on the hematological parameters of *P. orbignyanus* will be carried out in order to  
2027 establish reference values and contribute to the evaluation of resistance against infectious  
2028 diseases and to the increase of survival rates and reduction of cultivation costs.

2029 In this study, morphological features were analyzed. However, a combination of  
2030 quantitative and morphological methods is needed to provide more accurate data on the  
2031 characterization of fish blood cells of *P. orbignyanus*. The results of this study contribute  
2032 to the knowledge of the characteristics of blood cells of *P. orbignyanus* under normal  
2033 conditions and may be helpful as a tool to monitor the health status of this and other  
2034 flatfish species and to grant early detection of clinical pathology. Therefore, establishing  
2035 a baseline of information, as this work contributes to, on fish blood profile as a monitoring  
2036 tool for aquaculture systems may improve the welfare and the pathologic diagnosis (Fazio  
2037 et al. 2013).

2038

2039 **Acknowledgments**

2040

2041 L. Romano and L.A. Sampaio received productivity and research fellowships  
2042 from the Brazilian Council of Research, CNPq (Process number PQ 301002/2012-6 and  
2043 308014/2009-3).

2044

#### 2045 **Literature Cited**

2046

2047 Bianchini A, Robaldo RB, Sampaio LA. 2010. Cultivo do linguado *Paralichthys*  
2048 *orbignyanus*. In: Baldisserotto B, Gomes LC, editors. Espécies nativas para  
2049 piscicultura no Brasil. 2nd ed. UFSM: Santa Maria, RS.

2050 Cerqueira VR. 2005. Egg development of *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes,  
2051 1839). Braz Arch Biol Technol 48(3):459-465.

2052 Conroy DA. 1998. Manual de métodos y técnicas de laboratorio de uso común en la  
2053 hematología pisciaria. Pharmafish: Maracay, Venezuela. p 1-22.

2054 Esteban MA, Muñoz J, Meseguer J. 2000. Blood cells of sea bass (*Dicentrarchus labrax*  
2055 L.). Flow cytometric and microscopic studies. Anat Rec 258:80-89.

2056 Fänge R. 1994. Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish. Fish  
2057 Shellfish Immunol 4:405-411.

2058 Fazio F, Marafioti S, Filiciotto F, Buscaino G, Panzera M, Faggio C. 2013. Blood  
2059 hemogram profiles of farmed onshore and offshore gilthead sea bream (*Sparus*  
2060 *aurata*) from Sicily, Italy. Turkish J Fisheries Aquat Sci 13:415-422.

2061 Figueiredo JL, Menezes NA. 2000. Manual de peixes marinhos do Sudeste do Brasil.  
2062 Volume VI. São Paulo: Museu de Zoologia, USP.

2063 Filiciotto F, Fazio F, Marafioti S, Buscaino G, Maccarrone V, Faggio C. 2012.  
2064 Assessment of haematological parameters range values using an automatic method  
2065 in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Natura Rerum 1:29-36.

2066 Genten F, Terwinghe E, Danguy A. 2009. Atlas of fish histology. USA: Science  
2067 Publishers.

2068 Hartman FA, Lessler MA. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibia and  
2069 reptiles. Biol Bull 126(1):83-88.

2070 Kavamoto ET, Ranzani-Paiva MJT, Tokumar M. 1983. Estudos hematológicos em  
2071 “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val, 1840), teleósteo no estágio de desenvolvimento  
2072 gonadal maduro. B Inst Pesca, 10 (único):53-60.

- 2073 Lie Ø, Lied E, Lambertsen G. 1990. Haematological values in cod (*Gadus morhua*). Fis  
2074 K Dir Skr, Ser Eng. Vol III(1):11-17.
- 2075 Nikolov B, Boyadzieva-Doichinova D. 2010. Parameters of the red blood cell count in  
2076 three species of carp fishes. Bulgarian J Agric Sci 16(3):307-310.
- 2077 Ranzani-Paiva MJT, Rodrigues EL, Veiga ML, Eiras AC, Campos BES. 2003.  
2078 Differential leucocytes counts in “dourado” *Salminus maxillosus* Valenciennes  
2079 1840, from the Mogi-Guaçu River, Pirassununga, SP. Braz J Biol 63(3):517-525.
- 2080 Rodero A, Martínez AM, Marquin JL. 2003. Evaluación del autoanalizador hematológico  
2081 SYSMEX SF 3000 en mamíferos, aves, anfibios y peces. Rev Argentina Bioq  
2082 69:231-237.
- 2083 Santos AA, Egami MI, Ranzani-Paiva MJT, Juliano Y. 2009. Hematological parameters  
2084 and phagocytic activity in fat snook (*Centropomus parallelus*): Seasonal variation,  
2085 sex and gonadal maturation. Aquac 296:359-366.
- 2086 Satheeshkumar P, Ananthan G, Kumar DS, Jagadeesan L. 2011. Haematology and  
2087 biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost fishes from Vellar  
2088 estuary, India. Comp Clin Pathol 21(6):1187-1191.
- 2089 Satheeshkumar P, Ananthan G, Senthilkumar D, Khan AB, Jeevanantham R. 2012.  
2090 Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild  
2091 marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. Comp Clin  
2092 Pathol 21(3):275-281.
- 2093 Seriani R, Moreira LB, Abessa DMS, Abiyamara LD, Carvalho NSB, Maranhão LA,  
2094 Kirschbaum AA, Ranzani-Paiva MJT. 2010. Hematological analysis of  
2095 *Micropogonias furnieri*, Desmarest, 1823, Scianidae, from two estuaries of Baixada  
2096 Santista, São Paulo, Brazil. Braz J Oceanography, 58 (special issue IV SOB):87-92.
- 2097 Tavares-Dias M, Moraes FR, Imoto ME. 2008. Hematological parameters in two  
2098 neotropical freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and  
2099 *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae). Biosci J 24(3):96-101.
- 2100 Ueda IK, Egami MI, Sasso WS, Matushima ER. 1997. Estudos hematológicos em  
2101 *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Parte I. Braz J Vet  
2102 Res Anim Sci 34(5):270-275.
- 2103 Ueda IK, Egami MI, Sasso WS, Matushima ER. 2001. Aspectos citoquímicos das células  
2104 do sangue periférico de *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758)  
2105 (Cichlidae, Teleostei) – Parte II. Braz J Vet Res Anim Sci 38(6):273-277.

2106 Valdebenito I, Busse K, Jaramillo N, Hernández A. 2011. Blood cytology of the common  
 2107 jollytail (*Galaxias maculatus*) (Jenyns, 1842) (Osmeriformes: Glaxiidae) at  
 2108 postlarval and adult stages. Arch Med Vet 43:233-239.

2109 Vázquez GR, Guerrero GA. 2007. Characterization of blood cells and hematological  
 2110 parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei: Perciformes). Tissue Cell 39:151-  
 2111 160.

2112 Watson LJ, Shechmeister IL, Jackson LL. 1963. The hematology of Goldfish, *Carassius*  
 2113 *auratus*. Cytol 28:118.

2114

2115

2116

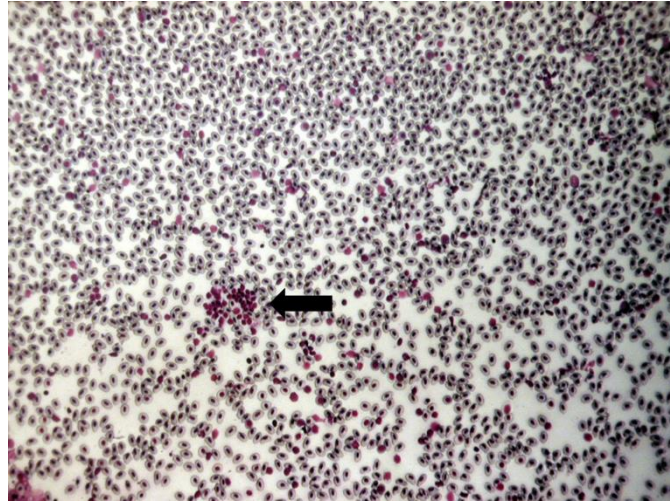
2117 Table 1. Cell size of the different cells found in the peripheral blood of adult *Paralichthys*  
 2118 *orbignyanus*.

	Cell type	Diameter (µm) (mean ± S.D.)
Erythrocytic series	Polychromatophilic erythroblast	13.18 ± 1.23
	Erythrocyte	14.20 ± 1.77
Granulocytic series	Granuloblast	23.47 ± 1.84
	Progranulocyte	11.71 ± 1.90
	Metagranulocyte	14.28 ± 2.13
	Polymorphonuclear granulocyte	11.23 ± 3.61
Monocytic series	Monoblast	14.81 ± 1.63
	Promonocyte	22.95 ± 1.29
Lymphocytic series	Lymphoblast	15.02 ± 1.72
	Lymphocyte	10.50 ± 2.69
Thrombocytic series	Thrombocyte	4.84 ± 0.97

2119

2120

2121



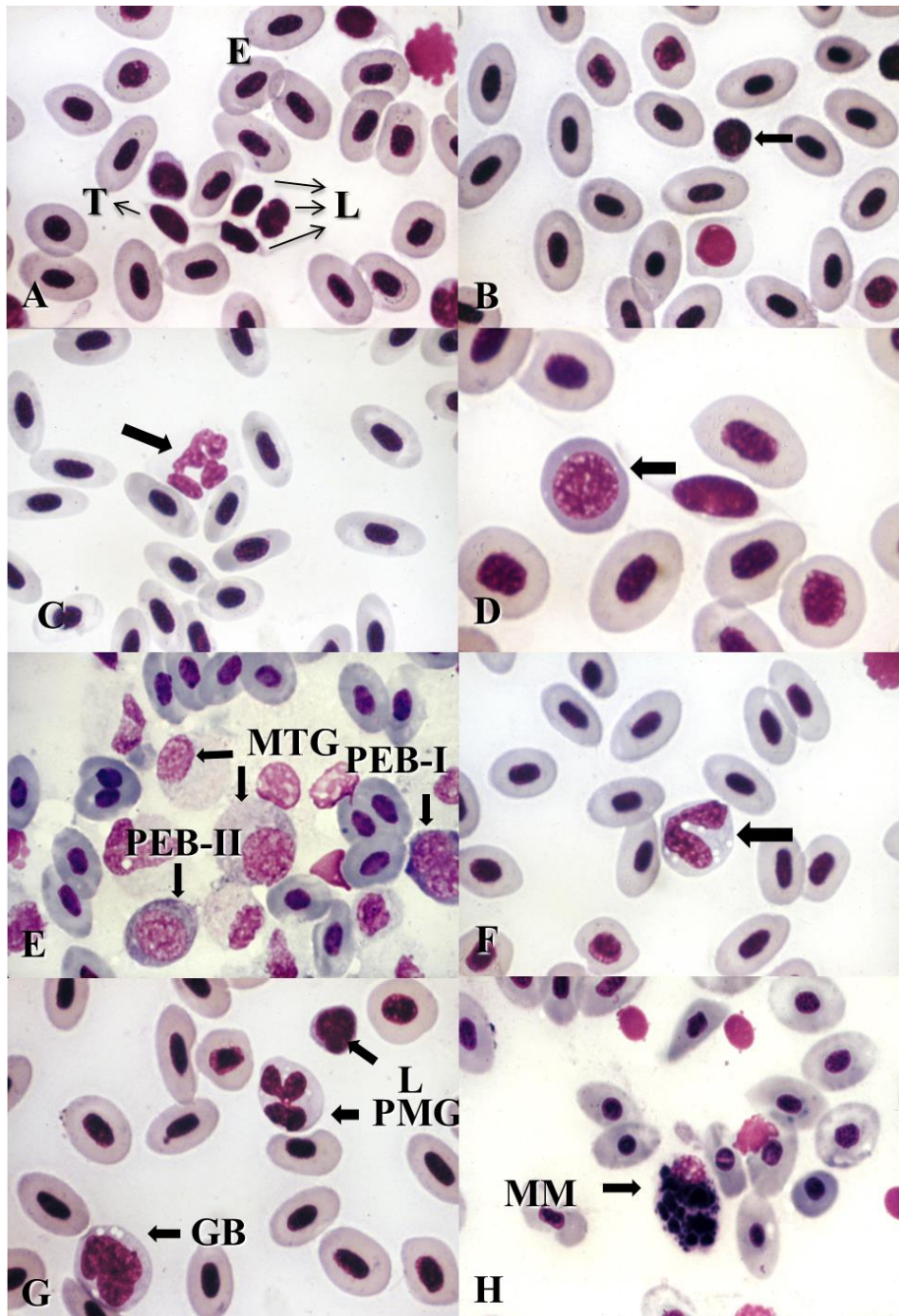
2122

2123 Figure 1. Peripheral blood cells in adults of Brazilian flounder, *Paralichthys orbignyanus*  
2124 stained with May-Grünwald-Giemsa. All the cells are nucleated and the arrow shows  
2125 white blood cells, or leucocytes. 400x.

2126

2127





2128

2129 Figure 2. Micrographs of the cells in the peripheral blood of *Paralichthys orbignyanus*  
 2130 stained with the May-Grünwald-Giemsa technique. 400x. A. Erythrocytes (E),  
 2131 lymphocytes (L) and thrombocyte (T). B. Lymphocyte. C. Granulocyte. D.  
 2132 Proerythroblast II. E. Metagranulocyte (MTG), proerythroblast I (PEB-I) and II (PEB-II).  
 2133 F. Progranulocyte. G. Lymphocyte (L), polymorphonuclear granulocyte (PMG) and  
 2134 granuloblast (GB). H. Melanomacrophage (MM).

2135

## DISCUSSÃO GERAL

2136

2137

2138 A aquicultura é o setor de produção de alimentos de mais rápido crescimento no  
2139 mundo (FAO 2012) e provê um suplemento significativo e substituto para peixes  
2140 selvagens. Entretanto, as doenças tornaram-se uma preocupação primária na aquicultura  
2141 e são responsáveis por severos impactos tanto no desenvolvimento econômico quanto  
2142 social em muitos países (Roberts 2012). Muitos fatores contribuíram para os problemas  
2143 de sanidade atualmente enfrentados pela aquicultura. Além da emergência de novas  
2144 doenças, e do seu potencial estabelecimento em novas áreas e populações selvagens, o  
2145 uso irresponsável de desinfetantes químicos e antibióticos também é cada vez mais  
2146 reconhecido como tendo potenciais impactos ambientais. Entretanto, a redução do uso de  
2147 antibióticos é possível através da produção e uso de vacinas para o controle de doenças  
2148 virais e bacterianas (Stoskopf 1993).

2149

2150 As vacinas são ferramenta de grande interesse para o controle de doenças de  
2151 etiologia infecciosa e sobretudo das que são endêmicas e pandêmicas (OIE 2009; OIE  
2152 2012). Para que haja sucesso na vacinação, é importante estimar a idade correta em que  
2153 se deve vacinar. Se os peixes são vacinados o quanto antes possível no cultivo, a  
2154 necessidade para drogas antibióticas é reduzida e a sobrevivência aumenta (Covello et al.  
2155 2013). Entretanto, se o sistema imune é estimulado quando os peixes são muito jovens,  
2156 antes que esteja desenvolvido, a tolerância pode ocorrer, com diminuição da resposta  
2157 secundária subsequente, e a vacina perde sua eficácia. Assim, a vacinação precoce não é  
2158 aconselhável (Padrós & Crespo 1996; Øvergård et al. 2011). Antes que a imunidade  
2159 adquirida esteja estabelecida, a possibilidade de melhorar os mecanismos de defesa no  
2160 linguado *P. orbignyanus* através de imunoestimulantes deve ser investigada. A  
2161 investigação da evolução do sistema imune, o desenvolvimento de vacinas, e a seleção de  
2162 linhagens resistentes a doenças ainda são limitados pela falta de conhecimento suficiente  
2163 sobre a imunidade de peixes (Zhu et al. 2013).

2163

2164 As larvas de *P. orbignyanus* eclodem com um comprimento total de 2 mm, olhos  
2165 não pigmentados e trato digestório fechado, além de um saco vitelínico e uma gota de  
2166 óleo, e sua sobrevivência depende apenas das reservas endógenas. Aos 3 dias após a  
2167 eclosão (dae) (23°C), as larvas começam a se alimentar exogenamente. Contudo, este é  
2168 um período crítico no desenvolvimento das larvas, pois há uma redução na taxa de  
2169 crescimento, o que sugere que as larvas possam não assimilar eficientemente o alimento  
ingerido e/ou a presa não possua um perfil nutricional adequado, tornando este um dos

2170 períodos críticos do desenvolvimento de *P. orbignyana*, podendo ocorrer altas taxas de  
2171 mortalidade (Bianchini et al. 2010).

2172 Outro período crítico para as larvas de *P. orbignyana* é a metamorfose, que ocorre  
2173 entre 15 e 30 dae, e é o momento em que elas mudam seu hábito pelágico para uma vida  
2174 bentônica, com a evidente migração do olho direito para o lado esquerdo do corpo e  
2175 subsequente assentamento. Após a metamorfose, os juvenis do linguado são levados à  
2176 transição alimentar do alimento vivo para a dieta seca, ainda que o momento adequado  
2177 para esta transição ainda não tenha sido demonstrado (Bianchini et al. 2010). Portanto,  
2178 estes dois momentos ainda são bastante delicados no cultivo, o que é confirmado pela  
2179 taxa de sobrevivência de larvas de *P. orbignyana* com um mês após a eclosão de 10 a  
2180 15% quando provenientes de desovas induzidas (Sampaio et al. 2008). Para esta espécie,  
2181 a exposição a antígenos do ambiente ocorre muito cedo no desenvolvimento para o  
2182 sistema imune adaptativo estar funcional, assim as larvas precisam apoiar-se apenas na  
2183 resposta não específica e na transferência materna de anticorpos (Patel et al. 2009).

2184 O desenvolvimento de órgãos imunes em peixes marinhos depende de inúmeros  
2185 fatores, incluindo a temperatura da água, tamanho dos ovos e duração do período  
2186 vitelínico (Corripio-Miyar et al. 2007). O estágio embrionário do linguado é curto quando  
2187 comparado com outras espécies, de modo que os sistemas ainda não estão completamente  
2188 desenvolvidos no momento da eclosão. A maioria dos órgãos, incluindo os relacionados  
2189 ao sistema imune, começa a se desenvolver durante o período entre a primeira  
2190 alimentação e o fim da metamorfose (4-20 dae).

2191 Os órgãos linfóides do linguado apareceram na seguinte sequência: rim (1 dae),  
2192 timo (5 dae) e baço (10 dae), semelhante à maioria das espécies de teleósteos marinhos  
2193 registrados na literatura (Chantanachookhin et al. 1991; Josefsson & Tatner 1993; Padrós  
2194 & Crespo 1996; Watts et al. 2003). A maturação do timo e do rim pode estar associada  
2195 com o tempo da primeira alimentação, o que também pode ser a primeira exposição a  
2196 potenciais patógenos (Chantanachookhin et al. 1991). Em termos de desenvolvimento  
2197 linfóide, o timo tornou-se linfóide antes do rim, ainda que mais pesquisas estejam sendo  
2198 desenvolvidas com imunohistoquímica e expressão gênica para efetivamente determinar  
2199 quando os linfócitos tímicos tornam-se imunocompetentes. A imunidade específica  
2200 humoral é marcada pela presença de células T e B maduras e células apresentadoras de  
2201 antígenos. O estudo histológico é uma análise indireta pois o aparecimento não  
2202 necessariamente é correlacionado com a maturidade (Zapata et al. 1997).

2203 O rim anterior é um importante órgão linfóide e hemopoiético em peixes e  
2204 possivelmente possui uma função fagocítica antes que a imunocompetência seja adquirida  
2205 (Chantanachookhin et al. 1991). Os centros melanomacrofágicos e os linfócitos em  
2206 associação com os vasos sanguíneos foram observados em todos os juvenis examinados,  
2207 sugerindo um sistema imune completamente operacional aos 50 dae (Press & Evensen  
2208 1999). É provável que o timo seja o órgão linfóide primário para células T e o rim anterior  
2209 seja o órgão linfóide primário para células B, como sugerido para a maioria das outras  
2210 espécies (Grontvedt & Espelid 2003).

2211 Neste estudo, os marcadores imunes RAG1, CD3, CD4-2 e IL-1b nos estágios  
2212 iniciais do desenvolvimento de *P. orbignyanus* foram analisados. Os dados obtidos neste  
2213 estudo são semelhantes aos padrões de expressão observados em vertebrados superiores  
2214 e em outras espécies de peixes (Huttenhuis et al. 2005; Corripio-Miyar et al. 2007;  
2215 Øvergård et al. 2011; Covello et al. 2013). Através das sequências obtidas com as PCRs  
2216 realizadas a partir do DNA genômico, os quatro genes puderam ser identificados, com  
2217 uma identidade variando de 71 a 100% quando comparados com as mesmas regiões dos  
2218 genes do linguado *P. olivaceus*.

2219 A expressão de RAG1 significativamente aumentada aos 10 dae está relacionada  
2220 com a detecção histológica do timo primordial aos 5 dae, mostrando que a partir deste  
2221 momento, a recombinação V(D)J já começou. Este resultado também pode ser  
2222 correlacionado com o aumento posterior da expressão dos transcritos de CD3 e CD4-2  
2223 aos 30 dae, sugerindo que há linfócitos T maduros neste estágio do desenvolvimento.  
2224 Mao et al. (2011) sugerem que mortalidades massivas possam estar relacionadas a  
2225 disordens no processo da recombinação V(D)J, pois a deficiência em RAG1 e RAG2 leva  
2226 ao completo bloqueio do desenvolvimento das células B e T. Os níveis de IgM não foram  
2227 analisados neste estudo, todavia pode-se sugerir que a diminuição dos níveis aos 45 dae  
2228 pode estar relacionada também com um aumento nos níveis de IgM e maturidade das  
2229 células B nos juvenis de *P. orbignyanus*.

2230 Os padrões de expressão do CD3 e CD4-2 foram semelhantes neste estudo, embora  
2231 os níveis de CD3 tenham sido maiores que os de CD4-2, o que foi esperado, pois todos  
2232 os linfócitos T carregam o correceptor CD3 na membrana, enquanto que somente as  
2233 células T auxiliares possuem os correceptores CD4/CD4-2 nas suas superfícies. O  
2234 alimento vivo com baixos níveis de DHA/EPA, baixa digestibilidade da *Artemia* sp. e  
2235 mudanças na sua composição lipídica poderiam influenciar os níveis de mRNA dos  
2236 marcadores imunes, junto com outros fatores atuando durante a metamorfose dos

2237 linguados. Neste estudo, RAG1 e IL-1b declinaram aos 45 e 60 dae, respectivamente.  
2238 Este declínio poderia estar relacionado com as condições nutricionais dos juvenis de *P.*  
2239 *orbignyana* após um período longo de alimentação com alimento vivo e transição  
2240 alimentar.

2241 O sangue de peixes é um espelho que reflete todos os processos vitais nos  
2242 organismos. O sangue dos adultos de linguado basicamente segue o padrão hematológico  
2243 de outros vertebrados. Os componentes celulares principais observados no sangue  
2244 periférico de *P. orbignyana* foram os eritrócitos, leucócitos (linfócitos, monócitos e  
2245 granulócitos) e trombócitos. Ocasionalmente, estágios imaturos também puderam ser  
2246 observados, não necessariamente indicando uma disfunção sanguínea.

2247 A função das células vermelhas é transportar gases respiratórios, e a sua  
2248 concentração é relacionada ao habitat e o tipo de locomoção das diferentes espécies de  
2249 peixes (Fänge 1994; Vázquez & Guerrero 2007). O eritrócito é o mais importante  
2250 carregador de oxigênio e dióxido de carbono. O tamanho e forma do eritrócito indicam a  
2251 superfície disponível para a troca destes gases nas funções respiratórias (Hartmann and  
2252 Lessler 1964). Uma célula pequena possui uma maior superfície de troca que uma célula  
2253 grande. A relação superfície/volume influencia todos os processos envolvendo a  
2254 membrana plasmática (Tavares-Dias et al. 2008). Assim, pode-se sugerir que os adultos  
2255 de *P. orbignyana* possuam um comportamento menos ativo em comparação com outros  
2256 peixes teleósteos, pois possuem eritrócitos maiores, presumivelmente menos eficientes  
2257 para o transporte de oxigênio. Entretanto, a baixa capacidade de carreamento de oxigênio  
2258 também pode refletir uma maior adaptação para sobreviver em ambientes com baixos  
2259 níveis de oxigênio e de fundo.

2260 O número de eritrócitos em *P. orbignyana* é mais alto que em outras espécies de  
2261 teleósteos ( $5.14 \times 10^6/\text{mm}^3$ ). Isto acontece provavelmente para melhorar a sua  
2262 performance pelo aumento do número de eritrócitos e possivelmente a concentração de  
2263 hemoglobina no sangue periférico (Tavares-Dias et al. 2008). Alto número de eritrócitos  
2264 tem sido associado com movimento rápido, natureza predadora e alta atividade em  
2265 ambientes como sistemas estuarinos intensivos (Satheeshkumar et al. 2011).

2266 Sabe-se que o estudo dos parâmetros hematológicos e características morfológicas  
2267 das células sanguíneas de peixes é importante para a aquicultura como uma ferramenta  
2268 para monitorar mudanças fisiológicas e patológicas nos peixes. Entretanto, Vázquez &  
2269 Guerrero (2007) citam que a coleta do sangue, técnicas de laboratório, variações sazonais,  
2270 tamanho, propriedades genéticas, sexo, densidade populacional, falta de alimento,

2271 estresse ambiental e transporte podem afetar os dados hematológicos. Cuidado deve ser  
2272 tomado quando se estabelecem intervalos de referência e são feitas comparações (Esteban  
2273 et al. 2000). Satheeshkumar et al. (2011) sugerem a introdução de checagens regulares  
2274 dos perfis sanguíneos dos peixes, pois estes procedimentos não necessitam matar o peixe  
2275 e podem ser aplicados repetidamente para os mesmos indivíduos. Mais estudos sobre os  
2276 parâmetros hematológicos de *P. orbignyanus* serão realizados para obter resultados mais  
2277 completos e possivelmente estabelecer valores de referência para os perfis sanguíneos do  
2278 linguado. Com esta informação básica sobre o sangue do linguado, valiosa para a  
2279 determinação dos parâmetros sanguíneos e também uma importante ferramenta  
2280 hematológica para o diagnóstico de patologias clínicas.

2281 Os dados obtidos neste trabalho oferecem um conhecimento essencial sobre a  
2282 biologia do linguado *P. orbignyanus*, e podem ser aplicados na aquicultura de modo a  
2283 obter uma melhora na reprodução, larvicultura e cultivo desta espécie. Genes  
2284 relacionados ao sistema imune de *P. orbignyanus* foram isolados, identificados e  
2285 sequenciados, tornando-se informação essencial para análises de expressão gênica. Estes  
2286 dados possibilitam não somente um maior conhecimento biológico sobre esta espécie e  
2287 seu desenvolvimento, como também possibilita comparações filogenéticas com outras  
2288 espécies de linguados e de peixes, possibilitando um melhor entendimento do  
2289 funcionamento do sistema imune em peixes e também em vertebrados em geral. Além  
2290 disso, o perfil normal das células sanguíneas, além da histologia normal dos órgãos  
2291 linfóides, oferece uma ferramenta para avaliação da condição dos reprodutores, pois  
2292 condições patológicas geralmente refletem-se na composição celular do sangue.

2293 Sabe-se que moléculas com funções imunológicas podem ser transferidas  
2294 maternalmente através do vitelo presente nos oócitos e posteriormente nas larvas recém-  
2295 eclodidas. A transferência materna destes componentes é extremamente importante para  
2296 a sobrevivência das larvas, especialmente em espécies cujas larvas eclodem com sistemas  
2297 rudimentares e passam por um período exclusivamente vitelínico antes de alimentarem-  
2298 se exogenamente, como o linguado *P. orbignyanus*. Após selecionados reprodutores  
2299 sadios, com perfis normais de células sanguíneas, os oócitos podem ser analisados  
2300 quantitativamente para a verificação da expressão gênica destas moléculas relacionadas  
2301 ao sistema imune. Os genes sequenciados neste estudo servirão como ferramenta  
2302 essencial para estas análises, possibilitando a seleção de oócitos para fertilização *in vitro*  
2303 que contenham uma maior expressão, por exemplo de IL-1 $\beta$ , molécula extremamente  
2304 importante do sistema inato.

2305 Após a fertilização *in vitro* utilizando os oócitos selecionados, poderão ser  
2306 realizadas análises histológicas dos órgãos linfóides e de expressão de genes imunes  
2307 durante a larvicultura, o que possibilita identificar se o sistema imune de larvas e juvenis  
2308 está se desenvolvendo normalmente, verificar em que momento podem apresentar  
2309 memória imunológica, analisar se o uso de imunoestimulantes e vacinação durante os  
2310 estágios iniciais do desenvolvimento é eficiente ou não, além de possibilitar a seleção de  
2311 indivíduos com uma melhor condição imune para cultivo, engorda e utilização em novos  
2312 experimentos. Este conhecimento é extremamente útil para reduzir as taxas de  
2313 mortalidade durante os estágios iniciais do desenvolvimento do linguado e melhorar as  
2314 taxas de sobrevivência e crescimento durante o cultivo e engorda, além de proporcionar  
2315 a seleção de reprodutores saudáveis para novas fertilizações. Assim, novos estudos neste  
2316 sentido são encorajados para que o cultivo do linguado seja possível na região sul do  
2317 Brasil, já que esta espécie possui uma grande importância econômica e elevado valor  
2318 comercial.  
2319  
2320

2321 **CONCLUSÃO GERAL**

2322

2323 - Os órgãos linfóides de *Paralichthys orbignyanus* apareceram na seguinte  
2324 sequência: rim (1 dae), timo (5 dae) e baço (10 dae), com células maduras e tecido  
2325 linfohematopoiético observados após 25 dae;

2326 - As proteínas RAG1 aumentaram aos 10 dae, seguindo a detecção do timo aos 5  
2327 dae, e precedendo o aumento nos níveis de mRNA de CD3 e CD4-2 aos 40 dae, sugerindo  
2328 que a recombinação V(D)J está acontecendo e os linfócitos T, especialmente as células T  
2329 auxiliares, estão aptas a reconhecer os antígenos e alavancar a resposta imune inata e  
2330 adaptativa.

2331 - Os níveis da citocina IL-1 $\beta$  aumentaram significativamente aos 30 dae, indicando  
2332 que os juvenis com essa idade possuem a capacidade de responder às infecções com um  
2333 estado pró-inflamatório.

2334 - Os tipos celulares detectados no sangue de adultos do linguado foram eritrócitos,  
2335 linfócitos, granulócitos e trombócitos, bem como estágios imaturos destas linhagens  
2336 celulares

2337 - A análise morfológica das células sanguíneas do linguado, especialmente dos  
2338 eritrócitos, indica que esta espécie possui um hábito menos ativo que outras espécies, e  
2339 está adaptada a ambientes estuarinos e bentônicos.

2340

2341



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 2342  
2343
- 2344 BIANCHINI, A, RB ROBALDO & LA SAMPAIO. 2010. Cultivo do linguado  
2345 (*Paralichthys orbignyanus*). In: B BALDISSEROTTO & LC GOMES (eds.).  
2346 Espécies nativas para piscicultura no Brasil. 2 ed. UFSM, Santa Maria.
- 2347 CHANTANACHOOKHIN, C, T SEIKAI & M TANAKA. 1991. Comparative study of  
2348 the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. *Aquac.*, 99:  
2349 143-155.
- 2350 CORRIPIO-MIYAR, Y, S BIRD, JW TREASURER & CJ SECOMBES. 2007. RAG-1  
2351 and IgM genes, markers for early development of the immune system in the gadoid  
2352 haddock, *Melanogrammus aeglefinus*, L. *Fish Shellfish Immunol.*, 23: 71-85.
- 2353 COVELLO, JM, S BIRD, RN MORRISON, AR BRIDLE, SC BATTAGLENE, CJ  
2354 SECOMBES & BF NOWAK. 2013. Isolation of RAG-1 and IgM transcripts from  
2355 the striped trumpeter (*Latris lineata*), and their expression as markers for  
2356 developmental of the adaptive immune response. *Fish Shellfish Immunol.*, 34: 778-  
2357 788.
- 2358 ESTEBAN, MA, J MUÑOZ & J MESEGUER. 2000. Blood cells of sea bass  
2359 (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow cytometric and microscopic studies. *Anat. Rec.*,  
2360 258: 80-89.
- 2361 FÄNGE, R. 1994. Blood cells, haemopoiesis and lymphomyeloid tissues in fish. *Fish*  
2362 *Shellfish Immunol.*, 4: 405-411.
- 2363 GRØNTVEDT, RN & S ESPELID. 2003. Immunoglobulin producing cells in the spotted  
2364 wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): localization in adults. *Dev. Comp. Immunol.*,  
2365 27: 569-578.
- 2366 HARTMAN, FA & MA LESSLER. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibia  
2367 and reptiles. *Biol. Bull.*, 126(1): 83-88.
- 2368 HUTTENHUIS, HBT, MO HUISING, T VAN DER MEULEN, CN VAN  
2369 OOSTERHOUD, NA SÁNCHEZ, AJ TAVERNE-THIELE, HWJ STROBAND &  
2370 JHWM ROMBOUT. 2005. Rag expression identifies B and T cell lymphopoietic  
2371 tissues during the development of common carp (*Cyprinus carpio*). *Dev. Comp.*  
2372 *Immunol.*, 29: 1033-1047.
- 2373 JOSEFSSON, S & MF TATNER. 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea  
2374 bream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.*, 3: 35-49.

- 2375 PADRÓS, F & S CRESPO. 1996. Ontogeny of lymphoid organs in the turbot  
 2376 *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. *Aquac.*, 144: 1-16.
- 2377 ØVERGÅRD, A-C, IU FIKSDAL, AH NERLAND & S PATEL. 2011. Expression of T-  
 2378 cell markers during Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) ontogenesis.  
 2379 *Dev. Comp. Immunol.*, 35: 203-213.
- 2380 PATEL, S, A-C ØVERGÅRD & AH NERLAND. 2009. A CD4 homologue in Atlantic  
 2381 halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): molecular cloning and characterization. *Fish*  
 2382 *Shellfish Immunol.*, 26: 377-384.
- 2383 PRESS, C & O EVENSEN. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes.  
 2384 *Fish Shellfish Immunol.*, 9: 309-318.
- 2385 ROBERTS, RJ. 2012. *Fish Pathology*. 4th ed. Wiley
- 2386 ROMBOUT, JHWM, HBT HUTTENHUIS, S PICCHIETTI & G SCAPIGLIATI. 2005.  
 2387 Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 19: 441-455.
- 2388 SAMPAIO, LA, RB ROBALDO & A BIANCHINI. 2008. Hormone-induced ovulation,  
 2389 natural spawning and larviculture of Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus*  
 2390 (Valenciennes, 1839). *Aquac. Res.*, 39: 712-717.
- 2391 SATHEESHKUMAR, P, G ANANTHAN, DS KUMAR & L JAGADEESAN. 2011.  
 2392 Haematology and biochemical parameters of different feeding behaviour of teleost  
 2393 fishes from Vellar estuary, India. *Comp. Clin. Pathol.*, 21(6): 1187-1191.
- 2394 STOSKOPF, MK. 1993 *Fish Medicine*, Saunders Press: London, pp. 490- 491.
- 2395 TAVARES-DIAS, M, FR MORAES & ME IMOTO. 2008. Hematological parameters in  
 2396 two neotropical freshwater teleost, *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae) and  
 2397 *Prochilonus lineatus* (Prochilodontidae). *Biosci. J.*, 24(3): 96-101.
- 2398 VÁZQUEZ, GR & GA GUERRERO. 2007. Characterization of blood cells and  
 2399 hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei: Perciformes). *Tissue*  
 2400 *Cell*, 39:151-160.
- 2401 WATTS, M, K KATO, BL MUNDAY & CM BURKE. 2003. Ontogeny of immune  
 2402 system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis*, Temminck nd Schlegel  
 2403 1844). *Aquac. Res.*, 34: 13-21.
- 2404 WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). 2009. OIE Guide for  
 2405 Aquatic Animal Health Surveillance. OIE, Paris, France.
- 2406 WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). 2012. Chapter 1.4.  
 2407 Aquatic animal health surveillance. In: *Aquatic Animal Health Code*, 15th edition.  
 2408 OIE, Paris, France.

- 2409 ZAPATA, A, B DIEZ, T CEJALVO, C GUTIÉRREZ-DE FRÍAS & A CORTÉS. 2006.  
2410       Ontogeny of the immune system of fish. *Fish Shellfish Immunol.*, 20: 126-136.
- 2411 ZHU, L, L NIE, G ZHU, L XIANG & J-Z SHAO. 2013. Advances in research of fish  
2412       immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity  
2413       in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.*, 39: 39-62.