

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Desenvolvimento dos órgãos linfóides de  
larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)  
em resposta a diferentes manejos  
alimentares**

**Amanda Halum Elias**

Jaboticabal, SP  
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Desenvolvimento dos órgãos linfóides de  
larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*)  
em resposta a diferentes manejos  
alimentares**

**Amanda Halum Elias**

**Orientadora: Dra. Maria Célia Portella**

**Co-Orientadora: Natalia de Jesus Leitão**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Aquicultura do Centro de  
Aquicultura da UNESP - CAUNESP,  
como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, SP  
2015

E42d Elias, Amanda Halum  
Desenvolvimento dos órgãos linfóides de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a diferentes manejos alimentares. / Amanda Halum Elias. -- Jaboticabal, 2015  
ii, 60 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2015  
Orientadora: Maria Célia Portella  
Co-orientadora: Natalia de Jesus Leitão  
Banca examinadora: Elisabeth Criscuolo Urbinati, Rosângela Kiyoko Jomori Bonichelli

Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Larvicultura. 3. Sistema Imunológico. 4. Transição alimentar. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.034

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

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**


**TÍTULO:** Desenvolvimento dos órgãos linfóides de larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a diferentes manejos alimentares

**AUTORA:** AMANDA HALUM ELIAS


**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA CÉLIA PORTELLA

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. NATALIA DE JESUS LEITÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Aquicultura, Área: AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

  
Profa. Dra. NATALIA DE JESUS LEITÃO  
Centro de Aquicultura da UNESP, CAUNESP, Jaboticabal-SP

  
Profa. Dra. ELISABETH CRISCUOLO URBINATI  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Profa. Dra. ROSANGELA KIYOKO JOMORI BONICHELLI  
Laboratório de Aquicultura / Faculdade "Dr. Francisco Maeda"- Fafram

Data da realização: 26 de novembro de 2015.

## Sumário

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Dedicatória.....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>Agradecimentos .....</b>   | <b>2</b>  |
| <b>ApoioFinanceiro .....</b>  | <b>4</b>  |
| <b>Resumo .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>Abstract .....</b>   | <b>6</b>  |
| <b>Introdução Geral .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Larvicultura .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>Exposição ao ar .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>Sistema Imunológico.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>ÓrgãosLinfoides .....</b>  | <b>13</b> |
| <b>Rim.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>Baço.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>Timo .....</b>   | <b>15</b> |
| <b>Sobre o Pacu.....</b>  | <b>15</b> |
| <b>Objetivo Geral.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>Objetivos específicos.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>Referências .....</b>  | <b>18</b> |
| <b>Manuscrito1 .....</b>  | <b>25</b> |
| <b>Desenvolvimento dos órgãos linfoides de larvas de pacu(<i>Piaractus mesopotamicus</i>) em resposta a diferentes manejosalimentares .....</b> | <b>25</b> |
| <b>Resumo .....</b>   | <b>26</b> |
| <b>Abstract .....</b>   | <b>27</b> |
| <b>Introdução.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>Material e métodos.....</b>  | <b>32</b> |
| <b>Instalações e condições experimentais .....</b>  | <b>32</b> |
| <b>Avaliação do desempenho .....</b>  | <b>33</b> |
| <b>Análises Morfológicas.....</b>   | <b>34</b> |
| <b>Teste de exposição ao ar .....</b>   | <b>34</b> |
| <b>Análise estatística .....</b>  | <b>35</b> |
| <b>Resultados.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>Crescimento e Sobrevivência.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>Análises Morfológicas.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>Fase de Alimentação Endógena.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>Alimentação Exógena .....</b>  | <b>37</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tolerância à exposição ao ar.....</b>                           | <b>40</b> |
| <b>Discussão .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>Crescimento e Sobrevivência.....</b>                            | <b>40</b> |
| <b>Exposição ao ar .....</b>                                       | <b>41</b> |
| <b>Desenvolvimento do timo, rim e baço em larvas de pacu .....</b> | <b>42</b> |
| <b>Conclusão.....</b>  | <b>46</b> |
| <b>Referências.....</b>  | <b>47</b> |
| <b>Legenda de Tabelas .....</b>                                    | <b>52</b> |
| <b>Legenda de Figura .....</b>                                     | <b>53</b> |
| <b>Figuras e tabelas.....</b>                                      | <b>55</b> |

## **Dedicatória**

Dedico a minha família Luiz Henrique Elias, Anice Hanna Halum Elias e Pedro Henrique Halum Elias, pois finalizo uma etapa importante em minha vida, que somente com o apoio incondicional deles poderia ter acontecido. Apoio, principalmente emocional, pois tiveram a paciência de me orientar e me entender em momentos difíceis, sempre ressaltando o meu potencial e acreditando que eu poderia finalizar essa fase com alegria e satisfação. Por isso e por toda a minha vida, lhes serei grata.

## **Agradecimentos**

À minha família, que sempre me apoiou e me incentivou em todas as fases da minha vida;

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Célia Portella, por sua contribuição em minha formação profissional, pelos seus ensinamentos e por acreditar em meu potencial;

À Dra. Natalia de Jesus Leitão, por sua paciência, pelos seus ensinamentos, por contribuir com a minha formação profissional, por me auxiliar em todos os momentos, e principalmente, pela sua amizade;

Aos membros participantes do exame geral de qualificação: Profa. Dra. Elizabeth Urbinati e Dra. Maria Do Carmo Farias Paes;

Aos membros da banca de defesa: Profa. Dra. Elizabeth Urbinati e Profa. Dra. Rosângela Kyoko;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido pela bolsa do meu mestrado;

Ao Prof. Dr. Sergio Ricardo Batlouni e seus alunos do Laboratório de Reprodução de Peixes, por fornecer as larvas para que fosse possível a realização do meu experimento. E também por ceder micrótomo durante o processamento das minhas amostras;

Ao Prof. Dr. Fernando Zara, a Márcia e seus alunos, por auxiliarem no processamento das minhas amostras histológicas;

À Profa. Dra Márcia Rita Fernandes Machado e sua aluna Dra. Taís Harumi de Castro Sasahara, por ceder o micrótomo para que eu pudesse finalizar o processamento das minhas amostras histológicas;

Aos meus amigos/irmãos que tive a satisfação de conviver durante o período de mestrado, ajudando nas coletas, na troca de experiências e conselhos, pelos momentos de descontração, carinho e risadas que tornaram essa fase bem mais prazerosa. Agradeço a Thyssia Bomfim, Juliana Tomomi, Thiago Mendes, Ivã Guidini, Frederico Werneck, Carol Nebo, Thalys Cruz, Andressa Innocente, Natalia Leitão, Raphael Serafini, Rodrigo Gimbo, Alejandra Osório, Ximena Rodríguez, Jesaias Ismael, Rudney Weiber, Juliano Coutinho, Thiago Torres, Lidiane Sandre, Lúgia Neira, Hellen Buzollo, Silvia Ligeiro;

Ao meu companheiro/amigo Willian Bruno Fernandes, que esteve sempre



ao meu lado, me escutando, me acalmando e me encorajando;

As minhas amigas Lorena Souza, Érica Camargo, Paloma Dominguez, Vânia Beatriz, Flávia Pamplona e Fernanda Guerzoni, que mesmo longe, sempre me apoiaram e me incentivaram;

As minhas amigas Élen Ramos, Rayane Barboza e Paula Kimie, que durante esse período tiveram paciência e entenderam a minha ausência em suas vidas, mas que independente da distância, nossa amizade continuou forte;

Ao meu companheiro de lar Bidu, que esteve sempre ao meu lado, enquanto escrevia a minha dissertação durante a madrugada, horas e mais horas, sempre pronto para me oferecer conforto e carinho desde o momento em que eu o ganhei;

Aos funcionários do Caunesp, que sempre me trataram com muito carinho e me auxiliaram em todos os momentos necessários;

A coordenação da Pós-Graduação, Veralice e David, pelo auxílio concedido e paciência para as inúmeras ligações diárias.

## **Apoio Financeiro**

CNPq, Bolsa de Mestrado, Processo nº830847/1999-5

PROAP, Auxílio Para Participação em Evento Internacional,  
Processo nº 806138/2014

## Resumo

O desenvolvimento dos órgãos linfoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) desde a eclosão até 34 dias de vida, e os efeitos de diferentes manejos alimentares sobre a ontogenia do sistema imunológico e a resistência das larvas à exposição ao ar foram avaliados neste estudo. Os manejos alimentares estudados foram: (TP) transição prematura de náuplios de artêmia para a dieta comercial iniciada aos oito dias após a primeira alimentação (12 dias pós-eclosão); (TT) transição tardia de náuplios de artêmia para dieta comercial iniciada aos 15 dias após a primeira alimentação (19 dpe) e (A) alimentação exclusivamente com náuplios de artêmia. As amostras para análises histológicas para descrição da ontogenia do rim, timo e baço foram tomadas duas vezes por dia, diariamente até os 13 dias pós-eclosão (dpe) (nove dias pós a primeira alimentação), uma vez ao dia até o 16 dpe (12 dias após a primeira alimentação) e, posteriormente, a cada três dias até o final do experimento. Biometrias foram realizadas na primeira alimentação, aos sete, 11, 16, 22 e 30 dias após o início da alimentação exógena. Um teste de resistência ao estresse (exposição ao ar por 1, 3, 5, 7 e 20 min) foi aplicado às larvas após 12 dias do término da transição alimentar prematura e tardia, respectivamente aos 22 e 29 dias de alimentação. A histogênese dos órgãos do sistema imune do pacu mostrou que o primeiro órgão a se tornar linfoide foi o timo aos 2 dpe, embora nos rins tenham sido observadas células indiferenciadas desde a eclosão. No início da alimentação exógena, aos 5 dpe, o rim da larva de pacu apresenta pequenos linfócitos e células eritropoiéticas dispersas entre os túbulos renais. O baço foi último órgão a se tornar linfoide, sendo observado a partir do 6º dpe como um órgão eritrocítico e, a partir do 16º dpe, o órgão torna-se linfoide. Ao final do experimento, com 34 dpe, o rim apresenta separação em pronefro (com monócitos, linfócitos e tecido hematopoiético) e mesonefro (com túbulos renais) e centros de melanomacrófagos. O parênquima tímico não apresenta divisão nítida entre as zonas cortical e medular, porém observam-se diferenças nos tipos celulares da região central e periférica do órgão. Nesse período, não foi possível observar nenhuma diferenciação de polpas no baço. Observou-se

que a transição alimentar, quando comparado ao tratamento de alimentação exclusiva de náuplios de artêmia, reduziu pela metade a sobrevivência das larvas ( $p < 0,05$ ), porém somente a transição alimentar prematura ocasionou menor taxa de ganho em peso e tamanho final das larvas ( $p < 0,05$ ). E ao submeter às larvas dos tratamentos ao teste de exposição ao ar pelo período de 7 minutos, verificou-se que a transição alimentar prematura apresentou maior mortalidade. Com isso, conclui-se que, a transição alimentar não interfere no desenvolvimento dos órgãos linfoides, visto que a ontogenia do rim e do timo iniciam-se ainda na fase de nutrição endógena e o baço durante os primeiros dias de alimentação exógena, período no qual há dependência de alimento vivo pelas larvas de pacu. Porém essa transição afetou o crescimento das larvas e a resistência ao estresse após sete minutos de exposição ao ar.

**Palavras-Chave:** *Piaractus mesopotamicus*; Larvicultura; Sistema Imunológico; Transição alimentar

### Abstract

The development of the lymphoid organs in pacu larvae (*Piaractus mesopotamicus*) since hatching until 34 days of age and the effects of different feeding protocols on the morphogenesis of the immune system and the resistance of air exposure were investigated. The feeding treatments studied were: (TP) early weaning, replacement of artêmia nauplii by commercial microdiet initiated at eight days after the first feeding; (TT) late weaning, replacement initiated at 15 after the first feeding; (ART) larvae fed exclusively artêmia nauplii. The histological samples to describe the ontogeny of the kidney, thymus and spleen were taken twice a day until 13 days post-hatch (dph), once a day until 16 dph and then each three days until the end of the experiment. On the first feeding day, 7, 11, 16, 22 and 30 days after the beginning of the active feeding, biometrics were made. A stress resistance test (air exposure for 1, 3, 5, 7 e 20 min) was applied to the larvae 12 days after the end of the early and late weaning, respectively, after 22 and 29 days of

feeding. The histogenesis of the lymphoid organs demonstrated that the first organ to become lymphoid was the thymus with 2 dph, although the kidney had been observed since the moment the larvae hatched. At 6 dph, the kidney show signs of differentiation. The spleen was the last organs to appear at 6 dph. At 35 dph the kidney had already differentiated into head kidney (with monocytes, lymphocytes and hematopoietic tissue) and posterior kidney (renal tubules). The thymic parenchyma didn't present differences, however the cells differentiated in the inner and outer zones and the spleen did not present differentiation between red and white pulp until this period. Comparing to the treatment that received only artemia nauplii, early and late weaning reduced de survival of the larvae. However, only the early weaning decreased the specific growth rate and weight gain and caused difference on larvae size and weight. The resistance test showed that larvae exposed to 7 minutes were affected and the early weaning treatment presented higher mortality ( $p < 0,05$ ). So, in conclusion, weaning did not interfere on the development of the lymphoid organs seeing that the ontogeny of the kidney and thymus began on the endogenous phase and the spleen on the initial feeding period. However, weaning interfered on the growth and survival of the larvae, especially when this processes is carry out early.

**Key-words:** *Piaractus mesopotamicus*; Larviculture; Immune System; Weaning.

## **Introdução Geral**

A aquicultura é a produção de organismos aquáticos em ambientes artificiais e que pode ser realizada em qualquer fase de desenvolvimento do animal (Valenti et al. 2000). Essa prática teve início na Ásia com a produção de peixes de água doce e, posteriormente, se espalhou pelos continentes englobando a maioria dos ambientes aquáticos e diferentes espécies. A partir de uma atividade de pequena escala não comercial e familiar, a aquicultura ganhou forças e se tornou uma atividade de produção e industrial de espécies de importante valor comercial (Subasinghe et al.2009).

A produção global de peixes oriunda da aquicultura tem crescido rapidamente nas últimas quatro décadas, contribuindo significativamente com o abastecimento mundial de peixes para o consumo humano. Com esse crescimento contínuo, espera-se que no futuro a aquicultura consiga produzir maior quantidade de alimento, superando assim, o total de organismos aquáticos capturados no ambiente natural para consumo humano (Subasinghe et al.2009).

A produção mundial de pescado, proveniente tanto da pesca extrativa quanto da aquicultura, atingiu aproximadamente 168 milhões de toneladas em 2010, representando um aumento de aproximadamente 3% em relação a 2009. Os maiores produtores foram a China com 63,5 milhões de toneladas, seguido pela Indonésia com 11,7 milhões, a Índia com 9,3 milhões e o Japão com cerca de 5,2 milhões de toneladas. Entretanto, o Brasil contribuiu com apenas 0,75% (1.264.765 t) da produção mundial de pescado em 2010, mas se destacou em relação à aquicultura continental. No ano de 2011, houve um aumento significativo na produção total nesse modelo de cultivo. Sua produção foi em média de 628.604 toneladas, representando um aumento de 31,1% em relação ao ano anterior (MPA2011).

### **Larvicultura**

Em geral, as larvas de peixes são organismos que eclodem em um estágio de desenvolvimento ainda bastante inicial em comparação às suas formas adultas (Kendall et al. 1984). A partir da eclosão, ocorre uma série de importantes mudanças em estruturas e funções devido à rápida evolução morfológica, fisiológica e comportamental pelos quais os peixes passam no início

de seu desenvolvimento (Blaxter 1986). Muitas das dificuldades para a produção de juvenis estão relacionadas à ausência de conhecimentos específicos sobre a biologia e fisiologia larval da maioria das espécies nativas produzidas comercialmente (Portella et al. 2012), mortalidade por predação (PARADIS et al. 1996), e também pela restrição alimentar e qualidade inadequada das dietas (Bock e Pandovani 2000). Por essas razões, a larvicultura de peixes representa um entrave para a produção de juvenis, principalmente devido às baixas taxas de sobrevivência nessa fase (Portella et al.2012).

O sistema de cultivo mais utilizado na produção de larvas e juvenis de peixes é o semi-intensivo, o qual consiste em transferir as larvas para viveiros previamente fertilizados, logo após a abertura da boca (Jomori et al. 2003), absorção parcial do vitelo e insuflação da vesícula gasosa (Bock e Pandovani 2000). Entretanto, de acordo com Cestaroli e Portella (1994), a criação de larvas em viveiros desde a primeira alimentação pode levar a um número variável de juvenis no final da larvicultura, pois esse sistema é altamente dependente das condições ambientais como a temperatura, qualidade da água, doenças, disponibilidade de alimento e presença de predadores. Portanto, a taxa de sobrevivência das larvas estocadas diretamente em viveiros costuma ser baixa, quando comparada a produção de larvas em laboratórios, em sistema intensivo (Jomori et al.2003).

Uma boa alternativa para diminuir as dificuldades encontradas e aumentar a taxa de sobrevivência desses animais no estágio mais crítico, é a larvicultura em sistema intensivo. Nesse sistema, a larvicultura é conduzida em tanques protegidos dentro de laboratórios, onde as larvas são mantidas em condições controladas, alimentadas com organismos vivos e/ou microdietas adequadas e em quantidades necessárias para o desenvolvimento desses animais. E posteriormente, quando os animais se encontram mais ágeis e com o desenvolvimento completo, são transferidos para o ambiente externo. Sob essas condições, há maiores chances de sobrevivência das larvas. Entretanto, esse processo encarece o custo da produção, sendo utilizado, no Brasil, apenas por alguns produtores de espécies carnívoras ou as de alto valor econômico (Jomori et al.2003).

## **Exposição ao ar**

Apesar do cultivo intensivo de larvas ser uma boa alternativa para aumentar a sobrevivência, esse processo também pode ser estressante, seja pela quantidade e qualidade do alimento ofertado, pela densidade de estocagem, pelo manejo ou até mesmo pela qualidade da água. Esses fatores podem levar ao aparecimento de doenças, prejudicando o crescimento e na qualidade desses animais. Portanto, a seleção de indivíduos adaptados e mais resistentes, pode ser um caminho para a obtenção de linhagens de melhor qualidade, mais resistentes e produtivas (Luz2004).

Sabe-se que a exposição ao ar é prejudicial à homeostase do peixe. Geralmente, essa exposição ocorre no manejo dos peixes, seja em laboratório ou cultivo, quando esses animais são capturados (Cooke e Suski 2003). Durante esse tempo, as lamelas entram em colapso, levando os filamentos lamelares a se unirem, impedindo a absorção do oxigênio (Suski et al. 2004). A duração do estresse também pode influenciar o tempo de recuperação das variáveis cardiovasculares (Cooke et al. 2001) e também dos parâmetros sanguíneos (Suski et al. 2004), podendo interferir na capacidade natatória desses animais (Schreer et al. 2005). A estratégia alimentar pode influenciar na sobrevivência das larvas após o estresse do manejo de transferências entre tanques, indicando que a alimentação inicial influencia na produção futura (Koven et al.(2001).

## **Sistema Imunológico**

A defesa do organismo contra substâncias estranhas como micro-organismos, toxinas ou células malignas é função primordial do sistema imune, o qual é capaz de responder frente a qualquer fator endógeno ou exógeno (Bayne e Gerwick 2001), disparando respostas compensatórias e adaptativas para que o equilíbrio dinâmico do organismo, ou homeostase, seja mantido (Baldisseroto et al. 2014). Assim como outras espécies, os peixes são suscetíveis a doenças causadas por patógenos, e a sua sobrevivência é determinada pela eficiência de seu sistema imunológico em combatê-los (Balfry e Higgs2001).

A suscetibilidade dos peixes é ainda mais acentuada dada a sua característica heterotérmica e ao seu contato intrínseco com o meio em que



vivem, no qual as constantes alterações físicas (como temperatura, manejo, alta densidade, confinamento, captura e transporte) e químicas (como a variação da concentração de oxigênio, amônia, nitrito e a presença de poluentes) são fatores preponderantes ao estresse e distúrbios de homeostase que desencadeiam a atividade do sistema imunológico (Costa 2012; Urbinati e Carneiro 2004; Urbinati et al. 2013). Além desses, fatores biológicos (e.g. presença de patógenos ou predadores) também são possíveis estressores.

Estudos morfológicos sobre o desenvolvimento inicial do sistema imunológico de peixes demonstraram que, apesar do mecanismo de desenvolvimento básico de teleósteos ser similar, existem diferenças a respeito do tempo de desenvolvimento dos órgãos (Mulero et al. 2008). Essas diferenças ocorrem, não somente em razão das variações do período embrionário ou do processo intrínseco e espécie-específico do desenvolvimento das larvas, mas também ao fato do desenvolvimento larval estar fortemente ligado às condições de cultivo, tais como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Falk-Peterson 2005).

Na eclosão, o sistema imunológico dos peixes, assim como os demais sistemas orgânicos, está em estágio inicial de desenvolvimento e, portanto apresenta uma funcionalidade parcial (Zapata et al. 2006). Inicialmente, a larva é protegida por substâncias imunológicas inatas, as quais são transferidas para os embriões pelas vitelogeninas (Magnadottir et al. 2005), as quais exercem um papel fundamental na sobrevivência larval (Mulero et al. 2008). Mais tarde, os órgãos linfoides timo, rim e baço atuam na proteção do organismo contra patógenos (Chantanachookhin et al. 1991).

Estudo sobre a organogênese do sistema imune em larvas de peixes são relativamente raros mesmo em espécies de grande importância na aquicultura mundial. Nesse cenário, destacam-se os trabalhos realizados com algumas espécies como truta arco-íris (Chettri et al. 2012; Heinecke et al. 2014), garoupa da Nova Zelândia (Parker et al. 2012), carpa (Huttenhuis et al. 2006), truta marrom (Cecchini et al. 2012), catfish (Petrie-Hanson e Ainsworth 2001), atum (Watts et al. 2003); *Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major* e *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhin et al. 1991)

O sistema imune inato é considerado a primeira linha de defesa contra organismos patogênicos e também contra qualquer tipo de material externo,

agindo até que o sistema imune adaptativo esteja apto a proteger o organismo (Holland e Lambris 2002). Esse sistema promove o sinal e as instruções necessárias para que o sistema imune adaptativo do animal reconheça a ameaça e realize as ações necessárias para combatê-la (Dixon e Stet 2001). Esses sinais são moléculas liberadas quando ocorrem ferimentos, infecções, inflamações ou apoptose celular (Matzinger 1998). Esse sistema é independente de exposições anteriores a qualquer tipo de organismos patogênicos e utilizam o padrão de receptores para reconhecer e conservar as moléculas que se ligam aos patógenos para combatê-las, podendo ser lipopolisacarídeos, peptídeos glicanos, lectina, proteína C-reativa, entre outros (Whyte2007).

Os componentes do sistema imune inato são divididos em parâmetros físicos, celulares e fatores humorais. São considerados parâmetros físicos as escamas de peixes, superfícies mucosas e brânquias, que agem como a primeira barreira de proteção contra infecções (Ellis 2001). Dentre esses parâmetros, o muco se destaca devido as suas propriedades imunológicas como lectinas, pentraxinas, lisossomos, proteínas complementares, peptídeos antibacteriano e IgM (Imunoglobulinas) (Roumbout et al. 1993). No sistema inato, as células principais são as fagocíticas, que inclui monócitos, granulócitos e macrófagos, juntamente com as células citotóxicas não-específicas (Evans et al. 2001). Já a classificação dos parâmetros humorais é comumente baseada no padrão específico de reconhecimento dos receptores ou da função específica das moléculas.

Por outro lado, o sistema imunológico adaptativo desempenha um importante papel contra infecções recorrentes, gerando células de memória e receptores específicos, tais como imunoglobulinas (Ig) e receptores de células T, permitindo assim uma eliminação mais rápida e eficiente do patógeno específico. O desenvolvimento de vacinas é baseado no princípio da imunidade adaptativa e essas tecnologias têm revolucionado a indústria de produção de peixes (Holland e Lambris2002).

A imunidade adaptativa em vertebrados é realizada através de dois grupos de linfócitos, classificados como células B (derivado da medula óssea) e células T (derivadas do timo). Enquanto células B produzem anticorpos específicos para neutralizar ou marcar os patógenos para que possam ser removidas pelo sistema

imune, as células T liberam fatores que coordenam as resposta de outras células imunológicas ou fatores citotóxicos que matam diretamente células infectadas ou que possuem alguma anomalia. Com isso, ambas as células respondem de uma maneira altamente específica, podendo se adaptar aos receptores antigênicos e também serem células de memória de grande duração (Laing e Hansen2011).

Células T convencionais dividem algumas características básicas assim que atingem a maturidade: todas elas possuem receptores de células T (TCR), em que reconhecem o antígeno presente pelo complexo de histocompatibilidade; possuem CD3, uma complexa molécula de sinalização, pelo qual os antígenos-TCR interagem propagando a ativação celular; possuem também as moléculas superficiais de co-estimulação (CD28) e de co-inibição (CTLA-4), também possuem as transmembranas (CD45) e a enzima intracelular (Lck e ZAP70), que garantem o balanço correto de ativação ou inibição dessas moléculas. Além disso, todas possuem o potencial de formar memória imunológica para se preparar para uma futura ameaça patogênica (Laing e Hansen2011).

Em peixes, as contribuições das células de memória B e células plasmáticas ainda não foram bem exploradas (Salinas et al. 2011). Nos mamíferos, tanto as células B de memória quanto do plasma celular, se estabelecem após uma infecção ou vacinação, entretanto essas populações são independentes entre si (Tangye e Tarlinton2009).

### **Órgãos Linfoides**

Diferente dos mamíferos, que apresentam medula óssea e linfonodos, o sistema imune de peixes teleósteos é composto apenas por órgãos e tecidos linfoides. Os principais órgãos são os rins, timo e baço (Woo 1992; Press e Evensen1999).

#### **Rim**

O rim dos teleósteos é composto por duas porções: a anterior ou rim cefálico (pronefro) e posterior ou rim excretor (mesonefro). O pronefro é dividido em duas partes de tecido hematopoiético, localizado na região escapular do peixe. O mesonefro encontra-se na região posterior à vesícula gasosa, aderido à coluna vertebral, estendendo-se longitudinalmente. É um órgão emparelhado,

com compartimentos anatômicos e funcionais (Press e Evensen 1999). O rim cefálico tem a maior concentração de células linfoides em desenvolvimento e não possui muitas de células secretoras de anticorpos (Rauta et al. 2012). O rim dos peixes recebe a maior parte do sangue após ter passado pelas brânquias e, quando apresenta lesões, pode ser um indicador de estresse (Kurtovic et al.2008).

O rim cefálico serve como suporte para o tecido hematopoiético, mas também tem um importante papel na imunidade não-específica e na recuperação de células danificadas (Press e Evensen 1999). As principais células encontradas nos rins são os macrófagos, que se reúnem em estruturas chamadas centros de melanomacrófos, no qual são encontrados em todos os estágios de desenvolvimento (Press et al. 1994). Os macrófagos são células mononucleares com capacidade fagocítica, encontrados no tecido dos órgãos do organismo. Regulam a ativação e a proliferação dos linfócitos T e B através de antígenos e células alogênicas. São, provavelmente, as células mais importantes do sistema imunológico, não somente pela sua capacidade de produzir citocinas, mas são as primeiras células a combater agentes patogênicos (Falcon2007).

Além de participar da fagocitose e do processamento de antígenos, o rim também é capaz de ajudar na formação de imunoglobulinas (IgM) e na memória imunológica. Posteriormente, essa estrutura serve como órgão endócrino, liberando corticosteróides e outros hormônios, sendo também a central de interações endócrinas-imunológicas (Brattgjerd e Evensen1996).

### **Baço**

O baço é composto por uma cápsula fibrosa e por trabéculas que se estendem pelo parênquima, no qual pode se dividir em dois tipos de polpa: a vermelha e a branca. A polpa vermelha, que ocorre na maior parte do órgão (Grace e Manning 1980; Secombes e Manning 1980; Junqueira e Carneiro 2004), consiste em uma 'rede' de células que oferece suporte para os capilares sanguíneos, que transportam inúmeros tipos de células, como as sanguíneas. A polpa branca não apresenta desenvolvimento tão completo como a polpa vermelha, e é dividida em duas regiões: uma região em que há um grande acúmulo de melanomacrófos e outra com grande incidência de células

elipsoides (Press e Evensen 1999).

As funções mais conhecidas do baço são a formação de linfócitos, a destruição de eritrócitos, a defesa do organismo contra invasores e o armazenamento de sangue (Junqueira e Carneiro 2008). Geralmente, o baço é o último órgão imunológico a se desenvolver e está localizado na parte dorsal, perto da cavidade do estômago e do ceco pilórico e, em alguns teleósteos, possui um papel mais proeminente no sistema imune não específico, do que no específico (Watts et al. 2003).

### **Timo**

O timo é considerado um órgão chave no sistema imunológico dos vertebrados (Bowden et al. 2005). Esse órgão possui dois lóbulos, é homogêneo e é representado por uma fina camada em formato oval de tecido linfóide, estando localizado subcutaneamente na parte dorsal do opérculo e revestido por um tecido mucoso do epitélio da faringe (Ellis 2001). A estrutura que caracteriza o timo de peixes é a cápsula que recobre o tecido. Basicamente, o timo pode ser considerado como uma aglomeração de macrófagos, que promove a proliferação e produção de células T (Davis et al. 2002), estimulação da fagocitose e rejeição de tecido não pertencentes ao organismo (Bowden et al. 2005).

A diferenciação da estrutura do timo é extremamente variável entre os teleósteos, e em muitas espécies, não é possível observar a diferenciação clara entre o córtex e a medula, ao contrário dos vertebrados superiores, em que esse órgão é de fácil visualização (Bowden et al. 2005). Ao longo do desenvolvimento, é possível encontrar células mielóides e eosinófilos granulares (Zatapa et al. 2006).

O desenvolvimento inicial do timo tem sido estudado em diferentes espécies de peixes teleósteos, e o tempo difere entre as espécies de acordo com os efeitos da temperatura no crescimento do animal. Essa relação entre o crescimento e o desenvolvimento pode ser bem dinâmica entre as espécies (Bowden et al. 2005). Porém, em espécies de peixes nativos, não existem muitos estudos relacionados à diferenciação do timo a partir da eclosão.

### **Sobre o Pacu**

Há mais de quinze anos as pesquisas com larvas de peixes conduzidas no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos do Centro de Aquicultura da UNESP (LANOA) estão direcionadas para compreender as características nutricionais, morfológicas e fisiológicas das larvas durante a ontogenia, visando ao desenvolvimento de técnicas que atendam suas necessidades e respeitem suas limitações específicas, em cada fase do desenvolvimento. As pesquisas concentram-se basicamente em três espécies nativas com diferentes hábitos e comportamentos alimentares, entre elas o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Portella et al. 2014). Entretanto, não há informações sobre o desenvolvimento de estruturas orgânicas relacionadas ao sistema imunológico dessa espécie na fase larval.

O pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é uma espécie que se destaca na piscicultura brasileira devido a sua capacidade de crescimento e desempenho no sistema de cultivo, por seu hábito alimentar e a sua fácil aceitação ao alimento inerte (Romagosa et al. 1988). Existe grande produção de pacus nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil, chegando ao total de produção em torno de 22 toneladas de pescado (MPA, 2011). Com o desenvolvimento de técnicas para o cultivo do pacu como propagação artificial e produção de alevinos, despertou o interesse científico sobre a espécie (Godinho et al.1977).

Assim como a maioria dos peixes neotropicais, o pacu apresenta um desenvolvimento indireto (*sensu* Balon 1959), com poucas reservas vitelínicas, esgotando-se entre dois a cinco dias, passando então, por uma curta fase mixotrófica. Larvas com esse desenvolvimento são consideradas altriciais (Portella et al. 2012). É uma espécie reofílica, que realiza migrações em época de desova. Possui uma vasta distribuição na bacia do Paraná/Paraguai, formado pelos rios Paraná e Paraguai, na bacia do Prata e, também, no encontro entre o rio da Prata, Uruguai e seus afluentes (Costa,2012)

## **Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo estudar o desenvolvimento dos órgãos linfoides a partir da eclosão até 34 dias de vida, quando submetidos a diferentes manejos alimentares

### **Objetivos específicos**

- Descrever o desenvolvimento dos principais órgãos linfoides do pacu: rim, timo e baço;
- Verificar a influência da transição alimentar prematura ou tardia, no desenvolvimento dos órgãos linfóides;
- Verificar a influência da transição alimentar no desempenho zootécnico na sobrevivência larval;
- Verificar a resistência das larvas quando submetidas ao teste de exposição ao ar, nos diferentes tratamentos.

## Referências

Baldisseroto, B; Cyrino, J.E.P; Urbinati, E.C. **Biologia E Fisiologia De Peixes Neotropicais De Água Doce.** p 203-231. 2014

Balfry, S.K. and D.A. Higgs. **Influence of dietary lipid composition on the immune system and disease resistance of finfish.** In: **Nutrition and Fish Health.** Lim, C. and C.D.Webster (Eds.) Haworth Press In., New York. p . 213-234. 2001.

Bayne, C. J.; Gerwick, L. **The acute phase response and innate immunity of fish.** Dev Comp Immunol.v 25. p 725-43. 2001.

Blaxter, J.H.S. **Development of sense organs and behavior of teleost larvae with special reference to feeding and predator avoidance.** Transactionsof American FisheriesSociety 115:98–114.1986.

Bock, C. L.; PADOVANI, C. R. **Considerações sobre a reprodução artificial e alevinagem de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) em viveiros.** Acta Scientiarum, v.22, p.495-501, 2000.

Bowden, T. J.; Cook, P.; Rombout, J. H. W. M. **Development and function of the thymus in teleosts.**Fish and Shellfish Immunology.V 19, p 413-427. 2005.

Chantanachookhin, C.; Seikai, T.; Tanaka, M. **Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish.** Aquaculture. v 99. p 143–155. 1991.

Brattgjerd S, Evensen Ø. **A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** Vet Pathol. v 33. p 55–65. 1996.

Cecchini, S.; Paciolla, M.; Biffali, E.; Borra, M.; Ursini, M. V.; Lioi, M. B. **Ontogenic profile of innate immune related genes and their tissue-specific expression in brown trout, *SalmoTrutta*, (Linnaeus, 1758).** Fish & Shellfish Immunology.v 35, p 988-992. 2013.

Chettri, J. K.; Raida, M. K.; Kania, P. W.; Buchmann, K. **Differential immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at early**



**developmental stages (larvae and fry) against the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri*.** *Developmental and Comparative Immunology*. v 36, p 463–474.2012.

Cooke, S.J., Philipp, D.P., Dunmall, K.M., Schreer, J.F. **The influence of terminal tackle on injury, handling time, and cardiac disturbance of rock bass.** *N. Am. J. Fish. Manage.* 21, 333–342. 2001.

Cooke, S.J., Suski, C.D., Barthel, B.L., Ostrand, K.G., Tufts, B.L., Philipp, D.P. **Injury and mortality induced by four hook types on bluegill and pumpkinseed.** *N. Am. J. Fish. Manage.* 23, 883–893.

Costa, G. C.; Lima, A.R.; Lima, M.G.; Kfoury Jr, J.R. **Histologia e ultraestrutura do rim e rim cefálico do pacu.** *Pesq. Vet. Bras.* v 32(5). p 453-458.2012.

Davis, J. M.; Clay, H.; Lewis, J. L.; Ghorri, N.; Herbomel, P.; Ramakrishnan, L. **Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading initiation of granuloma formation in zebrafish embryos.** *Immunity*. v 17. p 693– 702. 2002.

Dixon, B.; Stet, R. J. M. **The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish.** *Developmental & Comparative Immunology*. v 25. p 683-699. 2001.

Ellis, A. E. **Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria.** *Developmental and Comparative Immunology*.v 25. p 827–839.2001.

Evans, D. L.; Leary, J. H.; Jaso-Friedmann, L. **Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death.** *Dev. Comp. Immunology*. v 25. p 791- 805. 2001

Falk-Petersen, I.B. **Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish.***Fish & Shellfish Immunology*. v. 19. p 397- 412.2005.

Fange, R. **Lymphoid organs in sturgeons (*Acipenseridae*).** *Veterinary Immunology and Immunopathology*. v12 , p 153-161. 1986.

Grace, M. F.; Manning, M. J. **Histogenesis of the lymphoid organs in rainbow trout *Salmo gairdneri* (Rich. 1836).***Developmental and Comparative*

Immunology.v 4, p 255-264. 1980.

Godinho, H.M.; Brasile-Martins, M. A.; Fenerich, N. A.; Narahara, N. Y. **Fecundidade e tipo de desova do mandi, *Pimelodus maculatus*, Lacépède, 1803, (Pisces, Siluroidei)**. Revista Brasileira de Biologia. v 37, p 737-744. 1977.

Heinecke, R.D.; Chettri, J. K.; Buchmann, K. **Adaptive and innate immune molecules in developing rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* eggs and larvae: Expression of genes and occurrence of effect molecules**. Fish and Shellfish Immunology.p 1-9. 2014.

Holland, M. C. H.; Lambris, J. D. **The complement system of teleosts**. Fish and Shellfish Immunology. v 12. p 399-420. 2002.

Huttenhuis, H. B.T.; Taverne-Thiele, A. J.; Grou, C. P. O, Bergsma, J.; Saeij, J. P.J, Nakayas, C.; Rombout, J. H. W. M. **Ontogeny of the common carp (*Cyprinus carpio* L) innate immune system**. Developmental and Comparative Immunology.v 30, p 557–574. 2006.

Junqueira, L. C.; Carneiro, J. **Sistema Imunitário e órgãos linfáticos**. Páginas 254- 284 In: Histologia Básica. 10º edição. Editora Guanabara Koogan. 2004.

Jomori, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. **Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors**. Aquaculture. v.221, p 277 -287. 2003.

Kendall Jr., A. W., Ahlstrom, E. H. and Moser, G. H. **Early life history stages of fishes and their characters**. In Moser, G. H., Richards, W. J., Cohen, D. M., Fahay, M. P. 1984

Koven, W.M.; Barr, Y.; Lutsky, S.; Ben-Atia, I.; Weiss, R.; Harel, M.; Beherns, P.; Tandler, A. **The effect of dietary arachidonic acid (20:4n 6) on growth, survival and resistance to handling stress in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae**. Aquaculture, v.193, p.107 122, 2001.

Kurtovic, B.; Teskeredzic, E.; Teskeredzic, Z. **Histological comparison of spleen and kidney tissue from farmed and wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) Acta Adriatic**.v 49(2). p 147- 154. 2008

Laing, K.J and Hansen, J.D. **Fish T cells, recent advances through genomics**. *Developmental and Comparative Immunology*.v 35. p 1282-95.2011.

Luz, R. K. **Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentadas com diferentes dietas**. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.1, p.65-72, jan. 2007.

Magnadóttir, B.; Lange, S.; Gudmundsdóttir, S.; Bogwald, J.; Dalmo, R.A. **Ontogeny of humoral immune parameters in fish**.*Fish & Shellfish Immunology*.V 19, p 429-439. 2005.

Matzinger P. **An innate sense of danger**. *Immunology*. v 10, p 399-415. 1998.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W. **Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation**. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211- 268. 1999.

MPA . **Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura Brasil 2008/2009**. Brasília, 2010. 101p. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br/mpa/seap/Jonathan/mpa3/docs/anu%E1rio%20da%20pesca%20completo2.pdf>>. Acesso em: junho.2015.

Mulero, I.; Sepulcre, M.P.; Fuentes, I.; García-Alcázar, A.; Meseguer, J.; García- Alcázar, A.; Mulero, V. **Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immune competence**. *Molecular Immunology*, v. 45, 2981-2989.2008.

Paradis, A.R.; Pepin, P.; Brown, J.A. **Vulnerability of fish eggs and larva predation: review of the influence of the relative size of prey and predator**. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*.v.53, p. 1226.1235, 1996.

Parker, S.; La Flamme, A.; Salinas, I.**The ontogeny of New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*) lymphoid organs and IgM**. *Developmental and Comparative Immunology*.v 38, p 215–223.2012.

Petrie-Hanson, L.; Ainsworth AJ.**Humoral immune responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fry and fingerlings exposed to *Edwardsiella ictaluri***. *Fish and Shellfish Immunology*.v 9, p 579-589. 1999.

Portella, M. C., Leitão, N. J., Takata, R. and Lopes, T. S.. **Alimentação e nutrição de larvas**. In Fracalossi, D. M. and Cyrino, J. E. P. (Eds.): Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies nativas de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática, Florianópolis.p 185- 216.2012.

Portella, M.C.; Jomori,R.K.; Leitão, N.J.; Menossi, O.C.C.; Freitas, T.M.; Kojima, J.T.; Lopes, T.S.; Clavijo-Ayala, J.A.; Carneiro, D.J. **Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review**. Aquaculture. v 432 p 402–417. 2014.

Press, C. M. L.; Dannevig, B.H.; Landsverk, T. **Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar L*)**. Fish and shellfish Immunology.4,79-93. 1994.

Rauta, P.R.; Nayak, B.; Das, S. **Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms**. Immunology Letters 148 (2012) 23– 33.

Romagosa, E.; Paiva, P.; Godinho, H. M. **Desenvolvimento dos ovócitos de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1987)(=*Colossoma mitrei* Berg, 1985) em condições de cultivo intensivo**. Ciência e Cultura.v 63, p 60-64. 1988.

Press, C. McL.; Evensen, O. **The morphology of the immune system in teleost fishes**. Fish and Shellfish Immunology.V 9, p 309-318. 1999.

Rombout, J.H.W.M.; Huttenhuis, H.B.T.; Picchietti, S; Scapigliati, G. **Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes**. Fish & Shellfish Immunology. v 19. p 441-455. 2005.

Secombes, C. J.; Manning, M.J. **Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio***. Journal of Fish Diseases.v 3, p 399-412. 1980.

Rombout, J.H.W.M.; Taverne-Thiele, A.J.; Villena, M.I. **The gut associated lymphoid tissue (galt) of carp (*cyprinus carpio* L.): an Immunocytochemical**

**analysis.** Developmental and Comparative Immunology, Vol. 17, pp. 55-66, 1993.

Schreer, J.F., Resch, D., Gately, M., Cooke, S.J. **Swimming performance of brook trout following simulated catch-and-release angling: looking for air exposure thresholds.** N. Am. J. Fish. Manage. 25, 1513–1517.2005.

Subasinghe, R., Soto, D., Jia, J. **Global Aquaculture and its role in sustainable development.** Reviews in Aquaculture.v 1, p 2-9.2009.

Suski, C.D., Killen, S.S., Cooke, S.J., Kieffer, J.D., Philipp, D.P., Tufts, B.L. **Physiological significance of the weigh-in during live-release angling tournaments for largemouth bass.** Trans. Am. Fish. Soc. 133, 1291–1303. 2004

Tangye, S.D.;Tarlinton, D.M. **Memory B cells: effectors of long-lived immune responses.** EUR. J. Immunol. v 39. p 2065-2075.2009.

Urbinati, E.C.; Carneiro, P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixe em piscicultura. In: Cyrino,J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N. (Eds.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva.** Sociedade Brasileira de Aqüicultura e biologia Aquática. Editora Tecart, São Paulo, p. 171-193.2004.

Urbinati, E.C.; Gonçalves, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil.** Santa Maria: UFSM. p. 225-246. 2005.

Valenti, W. C., *et al.* (2000) **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável.** Ministério da Ciência e Tecnologia/CNPq, Brasília, 399.

Watts, M., Kato, K., Munday, B.L., Burke, C.M. **Ontogeny of immune system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis*, Temminck and Schlegel 1844).** Aquaculture Research. v 34, p 13-21.2003.

Woo, P. T. K. **Immunological responses of fish to parasitic organisms.** Annual Review of Fish Diseases.v 2. p 339- 366.1992.

Zapata, A.; Diez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-de Frías, C.; Cortés, A. **Ontogeny of the immune system of fish.** Fish & Shellfish Immunology.v 20, p

126-136.2006.

Whyte, S. K. **The innate immune response in finfish: a review of current knowledge**. Fish and Shellfish Immun. V 23, p 1127 – 1151.20

## **Manuscrito1**

### **Desenvolvimento dos órgãos linfoides de larvas de pacu(*Piaractus mesopotamicus*) em resposta a diferentes manejos alimentares**

*Submissão do manuscrito: Fish and Shellfish Immunology*

Amanda Halum Elias

Natalia de Jesus Leitão

Thyssia Bomfim Araújo da Silva

Juliana Tomomi Kojima

Thiago Mendes de Freitas

Maria Célia Portella<sup>1</sup>

UNESP- Univ. Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 14884-900, Jaboticabal  
SP, Brasil

<sup>1</sup>Autor Correspondente: [portella@caunesp.unesp.br](mailto:portella@caunesp.unesp.br)

## Resumo

O desenvolvimento dos órgãos linfoides de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) desde a eclosão até 34 dias de vida, e os efeitos de diferentes manejos alimentares sobre a ontogenia do sistema imunológico e a resistência das larvas à exposição ao ar foram avaliados neste estudo. Os manejos alimentares estudados foram: (TP) transição prematura de náuplios de artêmia para a dieta comercial iniciada aos oito dias após a primeira alimentação (12 dias pós-eclosão); (TT) transição tardia de náuplios de artêmia para dieta comercial iniciada aos 15 dias após a primeira alimentação (19 dias pós-eclosão); e (ART) alimentação exclusivamente com náuplios de artêmia. As amostras para análises histológicas para descrição da ontogenia do rim, timo e baço foram tomadas diariamente até os 13 dias pós-eclosão (dpe) (nove dias após a primeira alimentação), uma vez ao dia até o 16 dpe (12 dias após a eclosão) e, posteriormente, a cada três dias até o final do experimento. Biometrias foram realizadas na primeira alimentação, aos sete, 11, 16, 22 e 30 dias após o início da alimentação exógena. Um teste de resistência ao estresse (exposição ao ar por 1, 3, 5, 7, 20 min) foi aplicado às larvas após 12 dias do término da transição alimentar prematura e tardia, respectivamente aos 22 e 29 dias de alimentação. A histogênese dos órgãos do sistema imune do pacu mostrou que o primeiro órgão a se tornar linfoide foi o timo aos dois dpe, embora nos rins tenham sido observadas células indiferenciadas desde a eclosão. No início da alimentação exógena, aos 5 dpe, o rim da larva de pacu apresenta pequenos linfócitos e células eritropoiéticas dispersas entre os túbulos renais. O baço foi último órgão a se tornar linfoide, sendo observado a partir do 6º dpe como um órgão eritrocítico e, a partir do 16º dpe, o órgão torna-se linfoide. Ao final do experimento, com 34 dpe, o rim apresenta separação em pronefro (com monócitos, linfócitos e tecido hematopoiético) e mesonefro (com túbulos renais) e centros de melanomacrófagos. O parênquima tímico não apresenta divisão nítida entre as zonas cortical e medular, porém observam-se diferenças nos tipos celulares da região central e periférica do órgão. Nesse período, não foi possível observar nenhuma diferenciação de polpas no baço. Observou-se que a transição alimentar, quando comparado ao tratamento de alimentação exclusiva de náuplios de artêmia, reduziu pela metade a sobrevivência das larvas ( $p < 0,05$ ),



porém somente a transição alimentar prematura ocasionou menor taxa de peso e tamanho final das larvas ( $p < 0,05$ ). E ao submeter às larvas dos tratamentos ao teste de exposição ao ar pelo período de 7 minutos, verificou-se que a transição alimentar prematura apresentou maior mortalidade. Com isso, conclui-se que, a transição alimentar não interfere no desenvolvimento dos órgãos linfóides, visto que a ontogenia do rim e do timo iniciam-se ainda na fase de nutrição endógena e o baço durante os primeiros dias de alimentação exógena, período no qual há dependência de alimento vivo pelas larvas de pacu. Porém essa transição afetou o crescimento das larvas e a resistência ao estresse a partir de sete minutos.

**Palavras-chave:** *Piaractus mesopotamicus*; Larvicultura; Sistema Imunológico; Transição alimentar.

### Abstract

The development of the lymphoid organs in pacu larvae (*Piaractus mesopotamicus*) since hatching until 34 days of age and the effects of different feeding protocols on the morphogenesis of the immune system and the resistance of air exposure were investigated. The feeding treatments studied were: (TP) early weaning, replacement of artemia nauplii by commercial microdiet initiated at eight days after the first feeding; (TT) late weaning, replacement initiated at 15 after the first feeding; (ART) larvae fed exclusively artemia nauplii. The histological samples to describe the ontogeny of the kidney, thymus and spleen were taken twice a day until 13 days post-hatch (dph), once a day until 16 dph and then each three days until the end of the experiment. On the first feeding day, 7, 11, 16, 22 and 30 days after the beginning of the feeding, biometrics were made. A stress resistance test (air exposure for 1, 3, 5, 7 e 20 min) was applied to the larvae 12 days after the end of the early and late weaning, respectively, after 22 and 29 days of feeding. The histogenesis of the lymphoid organs demonstrated that the first organ to become lymphoid was the thymus with 2 dph, although the kidney had been observed since the moment the larvae hatched. Only 6 dph, the kidney show signs of differentiation. The spleen was the last organs to appear at 6 dph. At 35 dph the kidney had already differentiated into head kidney

(with monocytes, lymphocytes and hematopoietic tissue) and posterior kidney (renal tubules). The thymic parenchyma didn't present differences, however the cells differentiated in the inner and outer zones and the spleen did not present differentiation between red and white pulp until this period. Comparing to the treatment that received only artemia nauplii, early and late weaning reduced the survival of the larvae. However, only the early weaning decreased the specific growth rate and weight gain and caused difference on larvae size and weight. The resistance test showed that larvae exposed to 7 minutes were affected and the early weaning treatment presented higher mortality ( $p < 0,05$ ). So, in conclusion, weaning did not interfere on the development of the lymphoid organs seeing that the ontogeny of the kidney and thymus began on the endogenous phase and the spleen on the initial feeding period. However, weaning interfered on the growth and survival of the larvae, especially when this processes is carry out early.

**Keywords:** *Piaractus mesopotamicus*; Larviculture; Immune System; Weaning

## Introdução

A aquicultura é um setor de produção que vem crescendo continuamente e, por conseguinte, a preocupação com a saúde dos animais cultivados vem aumentando (Rombout et al. 2014). Um dos fatores chave para o crescimento sustentável dessa indústria é a produção de juvenis de alta qualidade (Conceição et al. 2009). Porém, devido ao aumento da produção mundial de peixes, o risco de infestações por agentes patogênicos tem aumentado cada vez mais, interferindo qualidade dos mesmos (Press e Lillehaug 1999).

O sistema imunológico é responsável por eliminar patógenos que possam causar diversos tipos de doenças. Esse sistema é composto por uma rede de componentes celulares e humorais que defende o organismo contra substâncias estranhas como microrganismos, toxinas ou células malignas, e responde a fatores como componentes endógenos ou exógenos que possuem a capacidade de estimular esse sistema. O sistema imune é dividido em inato e adaptativo (memória), ambos divididos entre defesa por células e fatores humorais (substâncias solúveis). Entretanto, já se sabe que esses dois sistemas trabalham juntos para destruir invasores ou desencadear processos de defesa (Ellis, 1998).

O sistema imunológico de larvas de peixe, na fase inicial de desenvolvimento, não apresenta a maturação completa necessária para que ocorra a emissão de respostas imunológicas para o combate de agentes patogênicos. Por isso, a imunização direta, talvez não melhore efetivamente a imunidade de larvas. Entretanto, acredita-se que ocorra a transferência da imunidade materna para a prole, aumentando assim, a proteção das larvas. Portanto, a imunidade materna pode ser utilizada com uma estratégia alternativa para promover a imunidade inicial das larvas, aumentando a taxa de sobrevivência nessa fase crítica de desenvolvimento. A imunização da mãe pode ser realizada através da alimentação com nutrientes específicos como vitaminas e outros, ou pela imunização dos animais com vacinas, contendo patógenos inativos (Zhang et al. 2013).

Os tecidos e órgãos que estruturam o sistema imunológico de peixes teleósteos são classificados em linfoides, não existindo a classificação mieloide, como em mamíferos, em razão da falta de medula e de linfonodos. Os principais órgãos linfoides são os rins (o maior órgão), timo, baço e vísceras associadas,

que são formados durante o desenvolvimento larval (Rombout et al. 2010). Os tecidos e órgãos linfoides são arranjados em redes de células reticulares, constituindo uma estrutura para as células do sistema inato e adaptativo, como os linfócitos, monócitos, macrófagos, granulócitos e trombócitos, mastócitos, células NK, citotóxicas e dentríticas. Esse suporte celular é responsável pela produção dos componentes do sistema imunológico (Salinas et al.2011)

O timo é considerado órgão chave no sistema imunológico de vertebrados. Essa estrutura se desenvolve como um epitélio fino na cavidade faríngea do trato gastrintestinal (Manley 2000), localizado atrás do opérculo, dorso-lateralmente às brânquias. A ontogenia e a histologia do timo diferem entre as espécies e é considerado um importante tecido que auxilia no desenvolvimento e maturação dos linfócitos T (Bowden 2005).

O rim é dividido em anterior (cefálico) e posterior (excretor), ambas com funções hematopoiéticas. Porém a primeira porção do órgão é mais importante para a produção de células de defesa (Meseguer et al.1994) e, diferentemente dos mamíferos, é o principal órgão imune responsável pela fagocitose (Danneving et al.1994), processamento de antígenos (Brattgjerd e Evensen 1996), e a formação de IgM e de células de memória pelos centros de melanomacróforos. A região do rim cefálico é formada por dois alongamentos em formato de Y, que são altamente innervados (Whyte 2007).

O baço possui uma camada fibrosa e uma pequena trabécula que se estende pelo parênquima, o qual se apresenta como polpa vermelha e branca. A polpa vermelha ocupa a maior parte do órgão (Secombes e Manning 1980), consiste em uma rede celular que suporta os capilares que detêm vasta população de células, incluindo macrófagos e linfócitos e também realiza fagocitose de células defeituosas ou antigas (Press e Evensen 1999). Já a polpa branca promove a hematopoiese com a formação de células de defesa. Entretanto, diferentemente dos mamíferos, essa divisão não é organizada na maioria dos peixes, embora em algumas espécies seja possível identificar essa diferença (Biller-Takahashi e Urbinati 2014).

O pacu é um dos peixes mais estudados no Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, devido ao seu destaque na piscicultura (Baldisseroto e Gomes 2013). Porém, estudos sobre o sistema imunológico do pacu e de outras espécies

brasileiras são escassos. A partir do conhecimento sobre os mecanismos e funções do sistema imunológico, é possível direcionar ações para reduzir a mortalidade, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento.

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivo descrever a morfologia os principais órgãos linfoides do pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e avaliar o desenvolvimento dos mesmos quando submetidos a diferentes manejos alimentares, a partir da fase inicial de desenvolvimento

## **Material e métodos**

### **Instalações e condições experimentais**

A larvicultura foi conduzida no Laboratório de Nutrição de Organismos Aquáticos (LANOA) do Centro de Aquicultura da UNESP (Caunesp), no Campus de Jaboticabal. As larvas de pacu foram obtidas por reprodução induzida no Laboratório de Reprodução de Peixes do Caunesp. Para instalação do experimento foram necessárias 15.000 larvas.

Após a eclosão, as larvas foram mantidas nas incubadoras até a abertura da boca e insuflação da vesícula gasosa (4 dpe;  $5,93 \pm 0,45$  mm de comprimento total e  $0,5 \pm 0,03$  mg de peso úmido), quando então foram transferidas para 15 tanques de polietileno, abastecidos com 100 litros de água proveniente de poço artesiano, em fluxo contínuo e aeração artificial constante. Para tanto, as larvas foram contadas individualmente e distribuídas nos tanques na densidade de 10 larvas L<sup>-1</sup>.

A fase experimental teve duração de 30 dias (34 dpe). O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de três tratamentos, com cinco réplicas cada. No início da alimentação exógena (5 dpe), as larvas de pacu foram alimentadas com náuplios de artêmia, recebendo quantidades diárias crescentes ajustadas a cada três dias (500 náuplios larva<sup>-1</sup>), segundo protocolo proposto por Jomori (2005) e adotado como rotina no LANOA. O início da fase de alimentação conjunta de alimento vivo e dieta formulada ocorreu aos oito (12 dpe) e 15 (19 dpe) dias após o início da alimentação exógena, para os tratamentos de transição alimentar prematura (TP) e tardia (TT), respectivamente. Durante a fase de alimentação conjunta (três dias), o alimento vivo foi diminuído gradualmente até sua supressão total (75%, 50%, 25%, respectivamente). A substituição total do alimento vivo pelo formulado ocorreu em dois momentos diferentes: aos 11 (15 dpe) e aos 18 (22 dpe) dias após a primeira alimentação. A dieta formulada Royal Seafood (Bernaqua, Bélgica, 54% de Proteína Bruta e 8% de Lipídios) foi fornecida em excesso, ou seja, em quantidade suficiente para que ocorressem sobras. Além desses tratamentos, um controle positivo foi utilizado, constituído por larvas alimentadas continuamente com náuplios de artêmia em quantidades crescentes (A). O

alimento vivo e a dieta formulada foram ofertados na frequência de seis vezes ao dia (07:00, 10:00, 13:00, 16:00, 19:00 e 22:00 horas). O experimento foi conduzido até que as larvas atingissem o estágio juvenil (*sensu* Kendall et al. 1984) (34dpe).

Com o auxílio de sonda multiparâmetro YSI 550A (Bernauer Aquacultura LTDA), a temperatura e oxigênio dissolvido foram aferidos diariamente às 07:30h e às 18:00h, juntamente com o pH (pHmetro de bolso portátil, marca KASVI) e a condutividade elétrica (condutivímetro portátil CD203, marca PHTEK). A água dos tanques foi coletada duas vezes por semana para o monitoramento de amônia total e nitrato. As variáveis de água apresentaram média de  $30,08 \pm 0,4$  de temperatura,  $6,64 \pm 0,06$  mg.L<sup>-1</sup> de oxigênio dissolvido,  $8,0 \pm 0,1$  de pH,  $207,6 \pm 0,8$   $\mu$ S/cm<sup>-1</sup> de condutividade elétrica,  $41,03 \pm 30,73$  mg.L<sup>-1</sup> de amônia total e  $131,78 \pm 29,10$  mg.L<sup>-1</sup> de nitrito. Os resíduos acumulados no fundo dos tanques foram removidos diariamente por sifonamento. O fluxo de água foi regulado para que ocorresse a renovação diária de cerca de cinco vezes o volume do tanque e a luminosidade foi diminuída pela disposição de placas de isopor cobrindo parcialmente a superfície dos tanques.

### **Avaliação do desempenho**

Para a avaliação do desempenho foram realizadas coletas no primeiro dia de alimentação, sete, 11, 16, 22 e 30 dias após o início do experimento. Em cada dia amostral, 20 larvas foram coletadas de cada réplica no período da manhã, anteriormente a primeira alimentação do dia, eutanasiadas em solução de benzocaína (0,1 mg L<sup>-1</sup>) e fixadas em solução de formaldeído a 10%. Foram mensurados o comprimento total (mm) e o peso úmido individual (mg), com o auxílio de paquímetro digital e balança analítica modelo JS-110 (precisão 0,0001g). Ao final do experimento, o ganho em peso (GP), a taxa de crescimento específico (TCE), o fator de condição alométrico (K) e a taxa de sobrevivência foram calculadas de acordo com as seguintes expressões, nas quais, **P** é o peso individual dos peixes; **CT** é o comprimento total individual dos peixes; **F** e **I** representam valores final e inicial; **d** é o número de dias entre as biometrias; **N** é o número de peixes.

$$GP \text{ (mg)} = P_F - P_I$$

$$\text{TCE (\% dia}^{-1}\text{)} = 100 \times (\text{Ln}_{\text{PF}} - \text{Ln}_{\text{PI}}) / d$$

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = 100 \times (\text{N}_{\text{F}} / \text{N}_{\text{I}})$$

$$K = \frac{P}{CT^b}$$

O valor de **b** foi obtido por meio da logaritimização dos dados de peso e de comprimento total de todas as larvas amostradas em todas as biometrias. Esses dados foram plotados em gráfico e o valor de **b**, foi obtido por meio da equação linear:

$$y = a + bx$$

Utilizaram-se todos os dados das biometrias para se obter um único valor de **b**, representativo para toda a fase experimental. O valor de **b** foi de 2,74.

### **Análises Morfológicas**

Após a eclosão, as amostras dos peixes foram tomadas de 12 em 12 horas até o 13º dia, uma vez ao dia nos dias 14, 15, 16, em seguida de três em três dias até o final do experimento para serem examinadas por microscopia de luz (cinco exemplares de cada repetição). Antes das coletas, as larvas foram eutanasiadas em solução de benzocaína (0,1 g L<sup>-1</sup>) e posteriormente, fixadas e preservadas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M e pH7,2.

As amostras fixadas foram incluídas em resina histológica (Historesina®, Leica, Germany), segundo recomendações do fabricante. Cortes histológicos transversais de quatro micrômetros de espessura foram obtidos em micrótomo utilizando-se navalhas de vidro e submetidos à coloração com Hematoxilina e Floxina B.

Através do microscópio BX43, o qual possui uma câmera fotográfica digital Olympus DP26 e com o auxílio do analisador de imagens CellSensStandart 1.8, foram visualizadas e capturadas as imagens das estruturas analisadas.

### **Teste de exposição ao ar**

Durante o experimento, foi realizado um teste de resistência com as larvas



dos diferentes tratamentos. Com 12 dias após a transição alimentar completa, larvas dos os tratamentos de transição prematura TP (22 dias de experimento) e tardia TT (29 dias de experimento) foram submetidas ao teste de exposição ao ar juntamente com o tratamento controle, para que houvesse comparação entre os tratamentos.

Para a realização do teste, foram usados 10 exemplares de cada réplica sendo expostas ao ar durante 1, 3, 5, 7 e 20 minutos. Durante o teste, as larvas foram colocadas em peneiras e após cada tempo de exposição, as larvas foram recolocadas na água e mantidas por 24 horas em recipientes em sistema estático e aeração artificial constante para monitoramento da mortalidade e mantidas separadamente das outras larvas até o final do experimento. Biometrias foram realizadas previamente ao teste.

### **Análise estatística**

Os resultados de comprimento total, peso, sobrevivência, taxa de crescimento específico e ganho em peso total foram analisados estatisticamente por meio de one-way ANOVA, considerando os resultados médios das réplicas de cada tratamento, usando o programa estatístico software R i386 3.2.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.Rproject.org>). Todas as variâncias biométricas foram submetidas a testes para a verificação da normalidade (Cramer Von Mises) e homoscedasticidade das variâncias (Brown and Forsythe). Os dados de sobrevivência foram transformados em  $y = \arcsen \sqrt{x/100}$ , onde x indica o valor da porcentagem da sobrevivência, para posterior análise da variância.

Para os resultados que apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ( $p < 0,05$ ), as médias foram analisadas pelo teste de Tukey.

## Resultados

### Crescimento e Sobrevivência

Os resultados da análise estatística mostraram diferenças no peso úmido e comprimento total das larvas somente no final do experimento, aos 30 dias de alimentação exógena (Tabelas 1 e 2). Os menores valores médios de peso e comprimento foram registrados nas larvas submetidas à transição prematura do alimento vivo para o formulado (TP). Não foram observadas diferenças estatísticas no peso e comprimento entre as larvas alimentadas apenas com náuplios de artêmia (A) e aquelas que receberam dieta formulada após transição tardia do alimento vivo (TT).

A análise estatística mostrou decréscimo na taxa de crescimento específico e do ganho em peso no tratamento TP, durante o período de substituição prematura do alimento vivo para o formulado, entre os dias oito e 11 (Tabelas 4 e 5). Diferenças estatísticas na TCE e GP também foram observadas no último intervalo de avaliação, entre os dias 23 e 30 (Tabela 4). As maiores médias ocorreram no tratamento TT, no qual a substituição dos náuplios de artêmia ocorreu tardiamente aos 18 dias. Por outro lado, a transição aos 11 dias causou redução da TCE e GP, assim como afetou o peso e tamanho final das larvas de pacu (Tabelas 2, 3, 4 e 5). A TCE e o GP do tratamento ART, no qual apenas náuplios de artêmia foram utilizados, não diferiu estatisticamente dos tratamentos TP e TT, em que transição alimentar foi realizada.

O fator de condição alométrico, calculado aos 30 dias de alimentação exógena, resultou em valores próximos a 3,5 (A=  $3,47 \pm 0,19$ ; TT=  $3,61 \pm 0,25$ ; TP=  $3,14 \pm 0,32$ ). Embora tenha sido observada diferença no tamanho e peso finais das larvas de pacu de acordo com o protocolo de primeira alimentação utilizado (Tabelas 2 e 3), nenhuma diferença estatística para o fator de condição foi observada entre os tratamentos

A taxa de sobrevivência no final do experimento (30 dias) diferiu significativamente entre os tratamentos. A maior taxa de sobrevivência foi registrada no tratamento A em que foi ofertado somente náuplios de artêmia, enquanto que a transição do alimento vivo para o formulado reduziu aproximadamente pela metade a sobrevivência das larvas (Figura 1). Entretanto

não foi observada diferença para a taxa de sobrevivência entre as larvas submetidas aos períodos de substituição prematuro (TP) e tardio (TT).

### **Análises Morfológicas**

A descrição do sistema imunológico das larvas do pacu foi dividida nas fases de alimentação endógena (até 4 dpe) e exógena (a partir de 5dpe).

#### **Fase de Alimentação Endógena**

Ao eclodir, as larvas ( $4,1 \pm 0,1$  mm e  $0,4 \pm 0,1$  mg), apresentaram o rim pouco desenvolvido, formado basicamente por um tubo retilíneo e células indiferenciadas, localizado dorsalmente ao intestino e ventralmente à musculatura esquelética (Figura 2A). Com 2 dpe ( $6,2 \pm 0,1$ mm e  $0,6 \pm 0,1$  mg), após consumo parcial da reserva vitelínica, foi observado um acúmulo de células cúbicas no órgão, com citoplasma fracamente corado e núcleo proeminente ocupando a região central. Células apresentaram-se organizadas em formato circular, indicando desenvolvimento de possíveis túbulos renais (Figura 2B).

O timo foi identificado a partir do 2º dpe (Figura 2C), composto por células basofílicas fortemente coradas pela hematoxilina.

Aos 4 dpe, o rim apresentava estruturas diferenciadas, os túbulos proximais estavam se destacando devido ao seu epitélio cúbico simples, constituído de células com núcleos esféricos, sendo possível também a observação da luz dos túbulos (Figura 2D)

#### **Alimentação Exógena**

Aos 5 dpe ( $6,2 \pm 0,2$  mm e  $0,8 \pm 0,1$  mg) (1º dia experimental), a reserva vitelínica havia sido consumida, a vesícula gasosa estava completamente inflada e a partir desse momento, foram ofertados náuplios de artêmia. Nesse dia, o timo apresentou aumento no volume celular, indicando o desenvolvimento do órgão, localizado no epitélio faríngeo, separado da cavidade branquial por uma camada única de epitélio (Figura 3A).

O baço foi o último órgão a se diferenciar. Somente a partir do 6 dpe ( $6,55 \pm 0,12$  mm e  $1,35 \pm 0,23$  mg) (2º dia experimental) foi possível observar o primórdio do órgão, situado dorsalmente ao intestino anterior e ventralmente à vesícula

gasosa. Nessa fase, o baço primordial era composto por células precursoras hematopoiéticas (Figura 3B). Aos 10 dpe ( $7,69 \pm 0,89$  mm e  $3,1 \pm 0,21$  mg) (6º dia experimental), o baço apresentou maior quantidade de vasos, com formato mais alongado, porém sem divisões no parênquima (Figura 3C).

Os túbulos renais distais também estavam desenvolvidos, apresentando estruturas semelhantes aos túbulos proximais, porém com o tamanho da luz levemente reduzida e apresentando células mais acidófilas. Foi possível identificar melanomacrófagos na estrutura, células hematopoiéticas em maior quantidade, ocupando parte do órgão. Nesse momento, observou-se também o desenvolvimento inicial de novos túbulos renais, com células pouco desenvolvidas, porém com organização circular, semelhante a túbulos maduros (Figura 3D).

O timo apresentava células diferenciadas, demonstrando leucócitos específicos como eosinófilos, timócitos e possíveis monócitos, porém o órgão ainda não apresentava maturação completa, sem definição de zona cortical ou medular e não possuía grande quantidade de vasos sanguíneos (Figura 3E).

Aos 16 dpe (12º dia experimental), as larvas do tratamento A ( $10,91 \pm 1,31$  mm e  $9,80 \pm 3,87$ ), TP ( $11,53 \pm 1,05$  mm e  $9,95 \pm 4,53$  mg) e TT ( $11,91 \pm 0,63$  mm e  $12,60 \pm 2,52$  mg) demonstravam desenvolvimento similar em todos os órgãos. Nesse momento, na porção cranial do rim, onde ocorre a maior produção de células hematopoiéticas no órgão, foi possível encontrar leucócitos específicos como neutrófilos, monócitos, linfócitos (Figura 4A). Já na porção posterior do órgão, os túbulos renais proximais se destacavam devido à maior quantidade dessas estruturas presentes. Foram identificados também, centros de melanomacrófagos em diferentes regiões, assim como vasos preenchidos com hemácias entre os túbulos renais (Figura 4B).

O timo apresentava os timócitos mais concentrados e em maior quantidade quando comparado ao período anterior. Porém ainda não era possível observar divisão do parênquima nem vasos em grandes quantidades (Figura 4C).

Ainda aos 16 dpe o baço apresentou aumento do volume celular quando comparado aos períodos anteriores, como era esperado devido ao crescimento do órgão, acompanhando o desenvolvimento da larva, além de ser possível observar o surgimento de hemácias e células linfoides, porém em pequeno

número (Figura 4D).

Aos 22 dpe (18º dia experimental), no mesonefro das larvas do tratamento A ( $13,41 \pm 0,8$  mm e  $33,5 \pm 8,88$ ), TP ( $13,14 \pm 1,50$  mm e  $31 \pm 9,89$  mg) e TT ( $13,94 \pm 0,97$  mm e  $35,6 \pm 8,0$ mg), foi possível observar estruturas como os túbulos proximais em maior número ao longo da extensão do órgão. Também foram identificados túbulos imaturos se desenvolvendo em certas regiões, indicando constante crescimento dessa estrutura, juntamente com Cápsulas de Bowman, cuja presença não havia sido observada nos períodos anteriores. Centros de melanomacrófagos estavam cada vez mais presentes ao redor do órgão, assim como vasos, que circundam a maioria dos túbulos (Figura 4E).

Nesse dia, o timo apresentou maior número de vasos sanguíneos, distribuídos ao longo do parênquima tímico, em maior número concentrado na região central do órgão (Figura 4F)

Aos 34 dpe (30º dia experimental), os animais dos tratamentos A ( $19,60 \pm 2,72$  mm e  $116,7 \pm 45,58$  mg), TP ( $18,50 \pm 3,34$  mm e  $99,4 \pm 43,02$  mg) e TT ( $20,89 \pm 3,22$  mm e  $139,60 \pm 48,75$  mg), possuíam desenvolvimento similar das estruturas linfoides, não apresentando diferenças morfológicas entre os tratamentos.

Observou-se que, nessa fase, o pronefro possuía maior quantidade de células de defesa como monócitos, linfócitos e tecido hematopoiético (Figura 5A), enquanto o mesonefro não apresentou diferenças estruturais quando comparado a outros períodos. Suas estruturas principais foram mantidas, apresentando diferenças somente no aumento da quantidade de células hematopoiéticas e de túbulos renais. Centros de melanomacrófagos também foram visualizados no órgão (Figura 5B).

Ao analisar o baço (Figura 5C), notou-se que o mesmo manteve a sua morfologia e composição celular, sendo constituído por hemácias, células reticulares e linfócitos. Não foi possível identificar a diferença entre polpa branca e polpa vermelha no órgão manteve sua estrutura morfológica ao longo da fase experimental.

Já o timo não apresentou divisão nítida entre zona cortical e medular (Figura 5D), porém ocorrem diferenças na concentração celular quando observado a região central do órgão (Figura 5E) e a periférica, onde ocorre a secreção das

células de defesa (Figura 5F).

### **Tolerância à exposição ao ar**

A exposição ao ar por até cinco minutos não provocou mortalidade nas larvas em nenhum dos tratamentos. Entretanto, a exposição por sete minutos causou 20% de mortalidade nas larvas submetidas à transição prematura do alimento vivo (TP) ( $p < 0,05$ ), enquanto que apenas 10% de mortalidade ocorreram nos tratamentos em foram fornecidos somente náuplios de artêmia (A) ou que sua substituição foi feita tardiamente (TT). Mortalidade total foi observada após a exposição das larvas ao ar por 20 minutos em todos os tratamentos.

## **Discussão**

### **Crescimento e Sobrevivência**

Estudos sobre a viabilidade e vantagens econômicas de criação de larvas de pacu alimentadas com náuplios de artêmia em sistema intensivo foram apresentados por Jomori et al (2003 e 2005). Com isso gerou-se a necessidade de conhecimentos mais aprofundados sobre a transição alimentar nessa espécie. Em alguns estudos como os de Tesser et al. (2005), Jomori et al. (2005), Leitão et al. (2011) e Menossi et al. (2012), foi demonstrado a ineficiência de se utilizar dietas formuladas desde a primeira alimentação da espécie e a necessidade de fornecer organismos vivos por alguns dias, na fase inicial de desenvolvimento. Portanto, é necessário que se conheça, em sistema de produção de larvas, o tempo mínimo para o uso do alimento vivo, visando aperfeiçoar o processo e diminuir o custo de produção.

O processo de substituição do alimento vivo pelo formulado, quando iniciado prematuramente, pode ser influenciado por fatores como: desenvolvimento insuficiente do sistema digestório para digerir e assimilar os nutrientes presentes na dieta (Menossi et al. 2012), utilização de dietas pouco atrativas o que resulta em baixa ingestão, ou ainda, uso de dietas que não atendam a exigência nutricional da espécie ou de baixa qualidade (Jomori 2005). As consequências desse processo podem ser observadas quando analisamos o comprimento total e

o peso úmido das larvas no último dia do experimento, aos 30 dias (35 dpe). Notou-se que as larvas submetidas à transição alimentar prematura apresentaram diferenças significativas quando comparado aos outros tratamentos, demonstrando prejuízo para o desenvolvimento do organismo.

O mesmo acontece com a taxa de crescimento específico e o ganho em peso, em que o tratamento prematuro apresenta diferenças estatísticas nos períodos de oito a 11 dias e 23 a 30 dias. Apesar de o tratamento tardio ter apresentado resultados inferiores ao tratamento prematuro e controle, no período de 17 a 22 dias em ambos os parâmetros de crescimento, foi possível observar que o tratamento prematuro foi o mais sensibilizado durante o período experimental. Hung et al. (2002) também verificaram redução na taxa de crescimento no momento em que houve a troca de do alimento vivo para o formulado em *Pangasius bocourti*. Da mesma forma, Person Le Ruyet et al. (1993) notaram diminuição do crescimento em larvas de *Dicentrarchus labrax* por um período de cinco dias após, quando o alimento foi substituído precocemente, enquanto os animais que passaram pela transição mais tardiamente, se adaptaram melhor ao alimento formulado. Portella (2000) observou também que em *Prochilodus scrofa*, ocorreu esse padrão de diminuição da taxa de crescimento ao longo do desenvolvimento do animal, sendo observado o mesmo padrão em *Coregnus larvaretus* (Dabrowski e Poczyczynski 1988).

O resultado da sobrevivência foi influenciado pela transição alimentar realizada durante a fase experimental, assim como foi observado em Jomori (2005), que também constatou que a retirada do alimento vivo pode impactar a sobrevivência dos animais, principalmente nos tratamentos de transição alimentar prematura. Demonstrou também que a sobrevivência foi maior no tratamento em que foi ofertado somente náuplios de artêmia, apresentando resultado semelhante ao presente estudo.

Os tratamentos que passaram pela transição alimentar não diferiram entre si, assim como foi observado em Menossi et al. (2012) onde os grupos que passaram por esse processo apresentaram taxas de sobrevivência intermediárias e também não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

### **Exposição ao ar**

Peixes, na fase inicial de desenvolvimento, são menos resistentes ao estresse do que os adultos (Bonga 1997). Entretanto, independente do manejo alimentar, os animais foram resistentes aos testes até cinco minutos de exposição. Com sete minutos, no entanto, as larvas do tratamento prematuro apresentaram mortalidade mais alta quando comparado às da transição tardia e às do controle. Luz e Portella (2005) submeteram larvas de *Hoplias lacerdae* ao teste de exposição ao ar, apresentando resultados de sobrevivência similares quando expostos a sete minutos. Sakakura et al. (1998) também expuseram larvas de *Seriola quinqueradiata* ao ar durante quatro minutos, entretanto as larvas eram alimentadas com dietas suplementadas com vitamina C e apresentaram taxas de sobrevivência menores do que os animais que foram submetidos ao teste nesse estudo. Entretanto, quando as larvas foram submetidas ao teste por 20 minutos, ocorreu a mortalidade total dos organismos, contrariando o que foi encontrado em Luz (2007). Ele avaliou a resistência à exposição ao ar por larvas da mesma espécie com 8, 11 e 15 dias de vida e também submetidas a diferentes manejos alimentares, relatando um índice de até 96% de taxa de resistência após 20 minutos de exposição ao ar pelos mesmos métodos.

### **Desenvolvimento do timo, rim e baço em larvas de pacu**

O pacu é uma das espécies mais cultivadas e estudadas na América do Sul e, conseqüentemente, apresenta maior número de informações sobre o seu desenvolvimento ontogenético (Portella et al. 2014). Porém, o conhecimento sobre a ontogenia do sistema imunológico em larvas de pacu e outras espécies de água doce é escasso e, por isso, o presente trabalho traz valiosas informações que poderão auxiliar estudos futuros aplicados à imunologia de peixes.

A histogênese dos órgãos linfoides do pacu segue o mesmo padrão observado em outros peixes de água doce (Zapata et al. 2006). O primeiro órgão a se tornar linfoide foi o timo aos 2 dpe, embora no rim tenham sido observadas células progenitoras indiferenciadas (mas não linfócitos) desde a eclosão. Essa seqüência de desenvolvimento dos órgãos linfoides foi descrita em *Danio rerio* (Lam et al. 2004), *Salmo gairdneri* (Grace e Manning 1980) e *Salmo salar* (Ellis 1977). Entretanto, nos peixes marinhos, como *Sebastiscus marmoratus* (Nakanishi 1986); *Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major*, *Paralichthys olivaceus*



(Chantanachookhin et al. 1991); *Sparus auratus* L (Josefsson e Tatner 1994); *Platichthys flesus* L. (Pulsford et al. 1994) *Gadus morhua* L (Schrøder et al. 1998) entre outros, a ordem em que os principais órgãos linfóides se desenvolvem é rim, baço e timo (Zapata et al. 2006).

As larvas de peixes eclodem em ambientes onde há inúmeros agentes patogênicos, no momento em que a sua capacidade imunológica ainda é bem limitada. Esses animais necessitam de defesas para auxiliá-los no combate a ameaças externas e tais defesas são constituídas por proteínas que estão envolvidas nas repostas inatas e adaptativas, que são transferidas através da mãe para a prole (Mulero et al. 2007). Entretanto, estudos demonstraram que apesar dessa proteção herdada da mãe, os peixes, na fase inicial, dependem fundamentalmente dos mecanismos próprios de defesa inata (Mulero et al. 2008), devido a maturação tardia dos órgãos linfóides e de sua imunocompetência, juntamente com a habilidade limitada de sintetizar anticorpos específicos antes de algumas semanas após a eclosão.

Larva vitelina de pacu aos 4 dpe apresenta timo colonizado com linfócitos. O epitélio tímico apresenta-se contínuo ao epitélio faríngeo, uma característica típica dos teleósteos (Chantanachookhin et al. 1991; Bowden et al. 2005). Em paulistinha ou peixe-zebra *D. rerio*, o timo primordial é visível mesmo antes da eclosão margeando a cavidade faríngea e, aos 4 dpe, o órgão já está totalmente desenvolvido (Zapata et al. 2006). Em *Salmo gairdneri*, o primórdio do timo também é observado antes da eclosão e, quando a larva eclode, já apresenta desenvolvimento completo (Grace e Manning 1980). Com o avanço do desenvolvimento larval do pacu, o timo mostra aumento no volume celular e destaca-se do epitélio da faringe. Schroder et al. (1998) relataram que o número de células no timo de *Gadus morhua* aumenta de acordo com a idade e desenvolvimento do animal.

Na eclosão, o rim da larva de pacu constitui um tubo simples e retilíneo formado por células indiferenciadas. Células indiferenciadas também estão presentes no rim de *Pagrus major* na eclosão, mas aparecem somente aos 3 dpe em *Seriola quinqueradiata* e aos 7 dpe em *Paralichthys olivaceus*. As células indiferenciadas caracterizam-se por ter o citoplasma fracamente corado e núcleo proeminente, mas, com o desenvolvimento, essas células tornam-se escuras e

menores, indicando a ocorrência de linfogênese (Chantanachookhinet *al.* 1991). Aos 5 dpe, a larva de pacu apresenta pequenos linfócitos e células eritropoiéticas dispersas entre os túbulos renais e nenhuma diferenciação é observada entre o pronefro e o mesonefro; o número de túbulos e a proporção de tecido linfo-hematopoiético aumentam com a idade das larvas.

O baço foi último órgão a se tornar linfoide na larva de pacu, sendo observado a partir do 6º dpe como um órgão primeiramente eritrocítico; somente a partir do 16º dpe, o órgão torna-se linfoide. Esse padrão tardio de desenvolvimento do baço também foi descrito em outros teleósteos, como *Salmo gairdneri* (Grace e Manning 1980), *Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major* e *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhinet *al.* 1991). Nas larvas de peixes teleósteos, o baço é um órgão mais eritropoiético que linfopoiético. Mesmo nas larvas de peixes marinhos, onde seu desenvolvimento ocorre anteriormente ao timo, a produção de linfócitos pelo baço é mais tardia (Zapata et al. 2006).

A ontogenia dos órgãos do sistema imune no pacu é bem similar às demais espécies de peixes teleósteos descritas na literatura, porém ocorrem diferenças quanto ao tempo de desenvolvimento dos órgãos, como relatado por Mulero et al. (2007<sup>a</sup>). Essas diferenças interespecíficas não ocorrem somente devido a variação no período embrionário ou a taxa de desenvolvimento larval, mas também pelo fato de que o desenvolvimento desses animais está fortemente ligado às condições de criação, como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Falk-Petersen 2005). No presente estudo, o desenvolvimento do rim, timo e baço foi estudado em larvas de pacu submetidas à transição precoce e tardia do alimento vivo para o formulado. Entretanto, não notamos diferença no desenvolvimento desses órgãos independente do período em que a transição alimentar foi realizada. A explicação plausível é que os principais eventos da ontogenia dos órgãos linfoides ocorrem no período de alimentação endógena ou logo no início da fase de alimentação exógena, quando as larvas de pacu ainda necessitam de alimento vivo (Portella et al. 2012, 2014) e estavam todas recebendo náuplios de artêmia.

Em todos os tratamentos, após 30 dias de alimentação exógena (34 dpe), o rim do pacu apresenta maior quantidade de células de defesa e são observados alguns centros de melanomacrófagos, assim como observado em *Seriola*

*quinqueradiata*, *Pagrus major* e *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhin et al. 1991). No timo foi possível notar que o seu parênquima não apresenta divisão nítida entre zona cortical e medular, porém ocorrem diferenças nos tipos celulares presentes na região central e a periférica do órgão. De acordo com Lam et al.(2004), a produção das células de defesa ocorre na periferia do timo. O baço manteve a sua morfologia e composição celular durante o desenvolvimento larval do pacu e nenhuma diferença óbvia das áreas de polpa branca e polpa vermelha foi identificada até os 34 dpe. Em animais mais velhos, a histologia do baço mostra que este órgão apresenta essas duas regiões distintas, constituídas por tecido linfoide (polpa branca) e tecido sanguíneo (polpa vermelha) (Costa 2012). A ausência de compartimentalização do órgão durante a metamorfose larval também foi descrita em *Gadus morhua* L (Schorder et al. 1998), *Danio rerio* (Zapata et al. 2006), *Seriola quinqueradiata*, *Pagrus major*, *Paralichthys olivaceus* (Chantanachookhin et al.1991).

## **Conclusão**

- Os órgãos linfóides começam a se desenvolver logo após a eclosão, demonstrando que esse sistema apresenta o desenvolvimento precoce, devido a sua importante função no organismo;

- A transição alimentar não interfere no desenvolvimento dos órgãos linfóides, visto que a ontogenia do rim e do timo ocorre ainda na fase de nutrição endógena e a do baço durante os primeiros dias de alimentação exógena, período no qual há dependência de alimento vivo pelas larvas de pacu;

- A transição alimentar reduz a sobrevivência na larvicultura do pacu, principalmente quando realizada precocemente, afetando o crescimento larval;

## Referências

Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria, Ed UFSM, 2010, 608p.

Biller-Takahashi, J.; Urbinati, E. Fish Immunology. **The modification and manipulation of the innate immune system. Brazilian studies**. Anais da Academias Brasileira de Ciências. V 86(3), p 1483-1495. 2014.

Bowden, T. J.; Cook, P.; Rombout, J. H. W. M. **Development and function of the thymus in teleosts**. Fish and Shellfish Immunology. V 19, p 413-427. 2005.

Bonga, S. E. W. **The stress response in fish**. *Physiol. Rev.*, **77** : (3), 591-625. 1997).

Brattgjerd S, Evensen Ø. **A sequential light microscopic and ultrastructural study on the uptake and handling of *Vibrio salmonicida* in phagocytes of the head kidney in experimentally infected Atlantic salmon (*Salmosalar L.*)**. Vet Pathol. v 33. p 55–65. 1996.

Chantanachookhin, C.; Seikai, T.; Tanaka, M. **Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish**. Aquaculture. v 99. p 143–155. 1991.

Costa, G. C.; Lima, A.R.; Lima, M.G.; Kfoury Jr, J.R. **Histologia e ultraestrutura do rim e rim cefálico do pacu**. Pesq. Vet. Bras. v 32(5). p 453-458. 2012.

Dabrowski, K.; Poczyczyński, P.J. **Laboratory experiment and mass rearing of coregonid fish fed exclusively on dry diets**. Aquaculture, v.69, p.307-316, 1988.

Danneving, B. H.; Lauve, A.; Press, C.; Landsverk, T. **Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells**. Fish and Shellfish immunology. v 4, p 3-18. 1994.

Ellis, A. E. **Fish immune system**. Encyclopedia of Immunology. p 920-925. 1998. Falk-Petersen, I.B. **Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish**. Fish & Shellfish Immunology. v. 19. p 397- 412. 2005.

Grace, M. F.; Manning, M. J. **Histogenesis of the lymphoid organs in**

**rainbow trout *Salmogairdneri* (Rich. 1836).** Developmental and Comparative Immunology. v 4, p 255-264. 1980.

Hung, L. T.; Tuan, N.A.; Cacot, P.; Lazard, J. **Larval rearing of the Asian Catfish, *Pangasius bocourti* (Siluroidei, Pangasiidae): alternative feeds and weaning time.** Aquaculture. v 212, p 115–127. 2002.

Jomori, R.K. **Organismos vivos e dietas secas na larvicultura do pacu *Piaractus mesopotamicus* e uso dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio como indicadores naturais da incorporação do alimento no tecido larval.** 2005. 121f. Tese (Doutorado em Aqüicultura de Águas Continentais) – UNESP, Jaboticabal.

Jomori, R.K.; Carneiro, D.J.; Malheiros, E.B. et al. **Growth and survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in ponds or at different initial larviculture periods indoors.** Aquaculture, v.221, p.277- 287, 2003.

Josefsson, S.; Tatner, M.F. **Histogenesis of the lymphoid organs in sea brea, *Sparus auratus* L.** Fish Shellfish Immunol 1993;3:35e50.

Lam SH, Chua HL, Gong Z, Lam TJ, Sin Y .**Development and maturation of the immune system in zebrafish, *Danio rerio*: a gene expression profiling, in situ hybridization and immunological study.** Developmental and Comparative Immunology 28, 9–28. 2004.

Leitão, N.J.; Pai-Silva, M.D.; Almeida, F.L.A. et al. **The influence of initial feeding on muscle development and growth in pacu *Piaractus mesopotamicus* larvae.** Aquaculture, v.315, p.78-85, 2011.

Luz, R.K.; Portella, M.C. **Tolerance to the air exposition test of *Hoplias lacerdae* larvae and juvenile during its initial development.** Brazilian Archives of Biology and Technology, v.48, p.567 573, 2005b.

Luz, R. K. **Resistência ao estresse e crescimento de larvas de peixes neotropicais alimentadas com diferentes dietas.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.42, n.1, p.65-72, jan. 2007.

Manley, N. R. **Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation.** SeminImmunol. v 12, P 421-428.2001.

Menossi, O. C.; Takata, R.; Sanches-Amaya, M. I.; Freitas, T. M.; Yúfera, M.; Portella, M. C. **Crescimento e estruturas do sistema digestório de larvas de pacu alimentadas com dieta microencapsulada produzida experimentalmente.** Revista Brasileira de Zootecnia. No prelo 2012

Mulero, I.; Sepulcre, M.P.; Fuentes, I.; García-Alcázar, A.; Meseguer, J.; García- Alcázar, A.; Mulero, V. **Vaccination of larvae of the bony fish gilthead seabream reveals a lack of correlation between lymphocyte development and adaptive immunocompetence.** Molecular Immunology, v. 45, 2981-2989.2008.

Nakanishi T. **Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, *Sebastes marmoratus*.** Vet Immunol Immunopathol. v12. p 213-21.1986.

Person Le Ruyet, J.; Alexandre, J.C.; Thébaud, L.; Mugnier, C. **Marine fish larvae feeding: Formulated diets or live prey?** Journal of World Aquaculture Society, v.24, p.211-224, 1993.

Portella, M. C., Leitão, N. J., Takata, R. and Lopes, T. S.. **Alimentação e nutrição de larvas.** In Fracalossi, D. M. and Cyrino, J. E. P. (Eds.): Nutriaqua: nutrição e alimentação de espécies nativas de interesse para a aquicultura brasileira. Sociedade Brasileira de Aquicultura e BiologiaAquática, Florianópolis.p 185- 216.2012.

Portella, M.C.; Jomori,R.K.; Leitão, N.J.; Menossi, O.C.C.; Freitas, T.M.; Kojima, J.T.; Lopes, T.S.; Clavijo-Ayala, J.A.; Carneiro, D.J. **Larval development of indigenous South American freshwater fish species, with particular reference to pacu (*Piaractus mesopotamicus*): A review.** Aquaculture. v 432 p 402–417. 2014.

Portella, M.C.; Verani, J.R.; Cestarolli, M.A. **Use of live and artificial diets enriched with several fatty acids sources to feed *Prochilodus scrofa* larvae and fingerlings. 1. Effects on survival and growth.** Journal of Aquaculture in the Tropics, v.15, n.1, p.45-58, 2000.

Press, C. M.; Lille-Haug, A. **Vaccination in European Salmonid aquaculture: a review of practices and prospects.** British Veterinary Journal.V

151, p 45- 46. 1995.

Press, C. McL.; Evensen, O. **The morphology of the immune system in teleost fishes**. Fish and Shellfish Immunology. V 9, p 309-318. 1999.

Pulsford, A.; Tomlinson, M.G.; Lemaire-Gony, S.; Glynn, P.J. **Development and immunocompetence of juvenile flounders, *Platichthys flesus* L.** Fish Shellfish Immunol. v 4. p 63-78. 1994.

Rombout, J. H. W. M.; Yang, G.; Kiron, V. **Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish**. Fish and Shellfish Immunology. V 40, p 634-643. 2014.

Rombout, J. H. W. M; Van de Wall, J.W; Companjen, A; Taverne, N; Taverne-Thiele, J.J. **Characterization of T cell lineage marker in carp, *Cyprinus carpio* L.** Developmental and Comparative Immunology. v.21, p. 35 – 46. 2010.

Salinas, I.; Zhang, Y., Sunyer, O. **Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish**. Developmental and Comparative Immunology. V 35, p 1346–1365. 2011.

Sakakura, Y.; Koshio, S.; Iida, Y.; Tsukamoto, K.; Kida, T. and Blom, J. H. **Dietary vitamin C improves the quality of yellowtail (*Seriola quinqueradata*) seedlings**. Aquaculture, 161, 427-436. 1998.

Schroder MB, Villena AJ, Jorgensen TO. **Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)**. Dev Comp Immunol. v 22. p 507-517. 1998.

Secombes, C. J.; Manning, M.J. **Comparative studies on the immune system of fishes and amphibians: antigen localization in the carp *Cyprinus carpio***. Journal of Fish Diseases. v 3, p 399-412. 1980.

Tesser, M.B.; Carneiro, D.J.; Portella, M.C. Co-feeding of pacu, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg (1887), larvae with *Artemia* nauplii and a microencapsulated diet. Journal of Applied Aquaculture, v.17, n.2, p.47-59, 2005.

Urbinati, E. C.; Gonçalves, F. D.; Takahashi, L. S. **Pacu *Piaractus mesopotamicus***. In: **Bernardo Baldisseroto; Levy de Carvalho Gomes. (Org.)**.



**Espécies Nativas para piscicultura no Brasil.** 2 edição revista e ampliada. Santa Maria: Editora UFSM, 2013, capítulo 8, p. 1-606.

Whyte, S. K. **The innate immune response in finfish: a review of current knowledge.** Fish and Shellfish Immunology. V 23, p 1127 – 1151.2007.

Zapata, A.; Diez, B.; Cejalvo, T.; Gutiérrez-de Frías, C.; Cortés, A. **Ontogeny of the immune system of fish.** Fish & Shellfish Immunology.v 20, p 126-136. 2006.

### Legenda de Tabelas

**Tabela 1.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do peso úmido (mg) de larvas de pacu alimentadas com artêmia (A) ou submetidas à transição alimentar do alimento vivo para o formulado aos 11 dias (TP) e 18 dias (TT) de alimentação exógena.

**Tabela 2.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão do comprimento total (mm) de larvas de pacu alimentadas com artêmia (A) ou submetidas à transição alimentar do alimento vivo para o formulado aos 11 dias (TP) e 18 dias (TT) de alimentação exógena

**Tabela 3.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão da taxa de crescimento específico (TCE,  $\% \cdot \text{dia}^{-1}$ ) das larvas de pacu alimentadas com artêmia (A) ou submetidas à transição alimentar do alimento vivo para o formulado aos 11 dias (TP) e 18 dias (TT) de alimentação exógena

**Tabela 4.** Valores médios  $\pm$  desvio ganho em peso (GP, mg) das larvas de pacu alimentadas com artêmia (A) ou submetidas à transição alimentar do alimento vivo para o formulado aos 11 dias (TP) e 18 dias (TT) de alimentação exógena

**Tabela 5.** Valores médios  $\pm$  desvio padrão da taxa de sobrevivência (%) das larvas de pacu após períodos crescente de exposição ao ar. As larvas do tratamento prematuro e tardio foram submetidas ao teste no 22º dia experimental (26 dpe) e no 29ª dia experimental (33 dpe), respectivamente.

### Legenda de Figura

**Figura 1.** Valores médios das taxas de sobrevivência das larvas de pacu ao final do experimento (30 dias de alimentação exógena). Larvas receberam náuplios de artêmia por todo período (A) ou foram submetidas à transição alimentar do alimento vivo para o formulado aos 11 dias (TP) e 18 dias (TT).

**Figura 2.** (A) 2 horas após a eclosão com rim em desenvolvimento (seta preta). (B) Rim aos 2 dpe, com túbulos (\*) e tecido hematopoiético (seta). (C) Timo aos 2dpe. (D) Rim aos 4 dpe com túbulos (seta pontilhada) e tecido hematopoiético (seta preta). (E) Timo aos 4dpe.

**Figura 3.** (A) Tratamento TP - Baço primordial aos 6 dpe. (B) Tratamento TT- Desenvolvimento do baço aos 10 dpe. (C) Tratamento TP - Rim aos 10 dpe, apresentando túbulos (cabeça de seta), túbulos em desenvolvimento (quadrado pontilhado), vasos (\*), centros de melano-macrófagos (seta branca) e tecido hematopoiético (TH). (D) Tratamento TP - Timo com 10 dpe, com possíveis monócitos (cabeça de seta), eosinófilos (seta) e timócitos.

**Figura 4.** (A) Tratamento TT - Pronefro aos 16 dpe apresentando células específicas como monócitos (seta verde), neutrófilo (seta amarela) e linfócito (seta branca). (B) Tratamento TT - Mesonefro aos 16 dpe, apresentando centros de melano-macrófagos (seta amarela) e vasos (seta vermelha). (C) Tratamento TT - Visão geral do timo aos 16 dpe. (D) Tratamento A - Detalhe da composição celular do baço aos 16 dpe, com linfócitos (seta amarela). (E) Tratamento A - Mesonefro aos 22 dpe, com Cápsula de Bowman aparente (seta preta), juntamente com centros de melano-macrófagos (seta vermelha). (F) Tratamento TP - Timo com 22 dpe, apresentando maior quantidade de vasos (seta amarela).

**Figura 5.** (A) Tratamento TP - Padrão celular do pronefro com 35 dpe, com monócitos (seta vermelha) e linfócitos (seta amarela). (B) Tratamento A - Mesonefro com 35 dpe, apresentando túbulos imaturos (quadrado pontilhado), centros de melano-macrófagos (seta vermelha) e vasos ao redor dos túbulos proximais (seta preta). (C) Tratamento A - Composição celular do baço aos

35dpe, com células reticulares (cabeça de seta), hemácias (seta vermelha) e linfócitos (seta amarela). (D) Tratamento A - Visão geral do timo aos 35 dpe. (E) Tratamento A - Detalhe na região central. (F) Tratamento TP - Região periférica do órgão.

## Figuras e tabelas

### Tabela1

| Tratamento | Dias de alimentação exógena |            |            |             |                           |
|------------|-----------------------------|------------|------------|-------------|---------------------------|
|            | 7                           | 11         | 16         | 22          | 30                        |
| A          | 5,32±0,82                   | 11,02±2,91 | 31,61±6,14 | 66,80±17,18 | 120,55±18,82 <sup>a</sup> |
| TP         | 5,85±0,81                   | 9,28±3,13  | 29,45±9,15 | 53,82±4,30  | 71,72±9,37 <sup>b</sup>   |
| TT         | 5,98±0,32                   | 12,48±2,52 | 36,35±8,21 | 51,61±7,71  | 121,80±13,82 <sup>a</sup> |

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### Tabela 2

| Tratamento | Dias de alimentação exógena |            |            |            |              |
|------------|-----------------------------|------------|------------|------------|--------------|
|            | 7                           | 11         | 16         | 22         | 30           |
| A          | 8,98±0,22                   | 11,52±0,80 | 13,31±0,50 | 14,87±0,64 | 19,51±0,86 A |
| TP         | 9,07±0,44                   | 11,37±0,94 | 13,11±0,93 | 15,41±0,56 | 16,82±0,34 B |
| TT         | 9,00±0,24                   | 11,67±0,60 | 13,86±0,68 | 16,00±1,28 | 19,29±0,71 A |

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

### Tabela3

| Tratamento | Dias de alimentação exógena |              |            |            |              |
|------------|-----------------------------|--------------|------------|------------|--------------|
|            | 0 – 7                       | 8 – 11       | 12 – 16    | 17 – 22    | 23 – 30      |
| A          | 33,65±2,27                  | 18,42±3,98 A | 21,42±3,21 | 11,72±4,64 | 7,59±4,72 AB |
| TP         | 35,43±2,04                  | 11,73±3,58 B | 23,76±4,80 | 9,59±3,99  | 3,42±1,81 B  |
| TT         | 35,02±0,77                  | 18,35±1,35 A | 20,83±5,00 | 5,20±0,36  | 11,27±1,74 A |

\*TCE, taxa de crescimento específico =  $100 \times (\ln \text{ peso final} - \ln \text{ peso inicial}) / \text{dias}$ .

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 4**

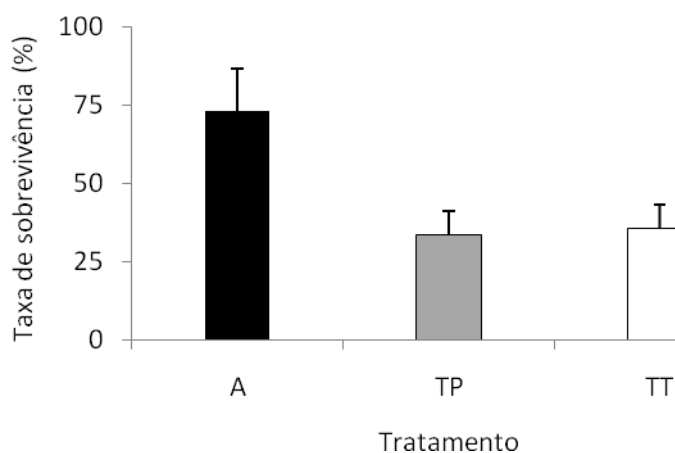
| Tratamento | Dias de alimentação exógena |             |            |             |                |
|------------|-----------------------------|-------------|------------|-------------|----------------|
|            | 0 – 7                       | 8 – 11      | 12 – 16    | 17 – 22     | 23 – 30        |
| A          | 4,84±0,82                   | 5,68±0,83 A | 21,47±4,82 | 34,31±16,70 | 53,75±32,08 AB |
| TP         | 5,38±0,81                   | 3,42±0,81 B | 21,89±7,65 | 23,06±7,95  | 17,48±10,00 B  |
| TT         | 5,50±0,31                   | 6,50±0,31 A | 19,43±4,68 | 12,23±12,25 | 72,51±14,21 A  |

\*GP, ganho em peso = peso final – peso inicial.

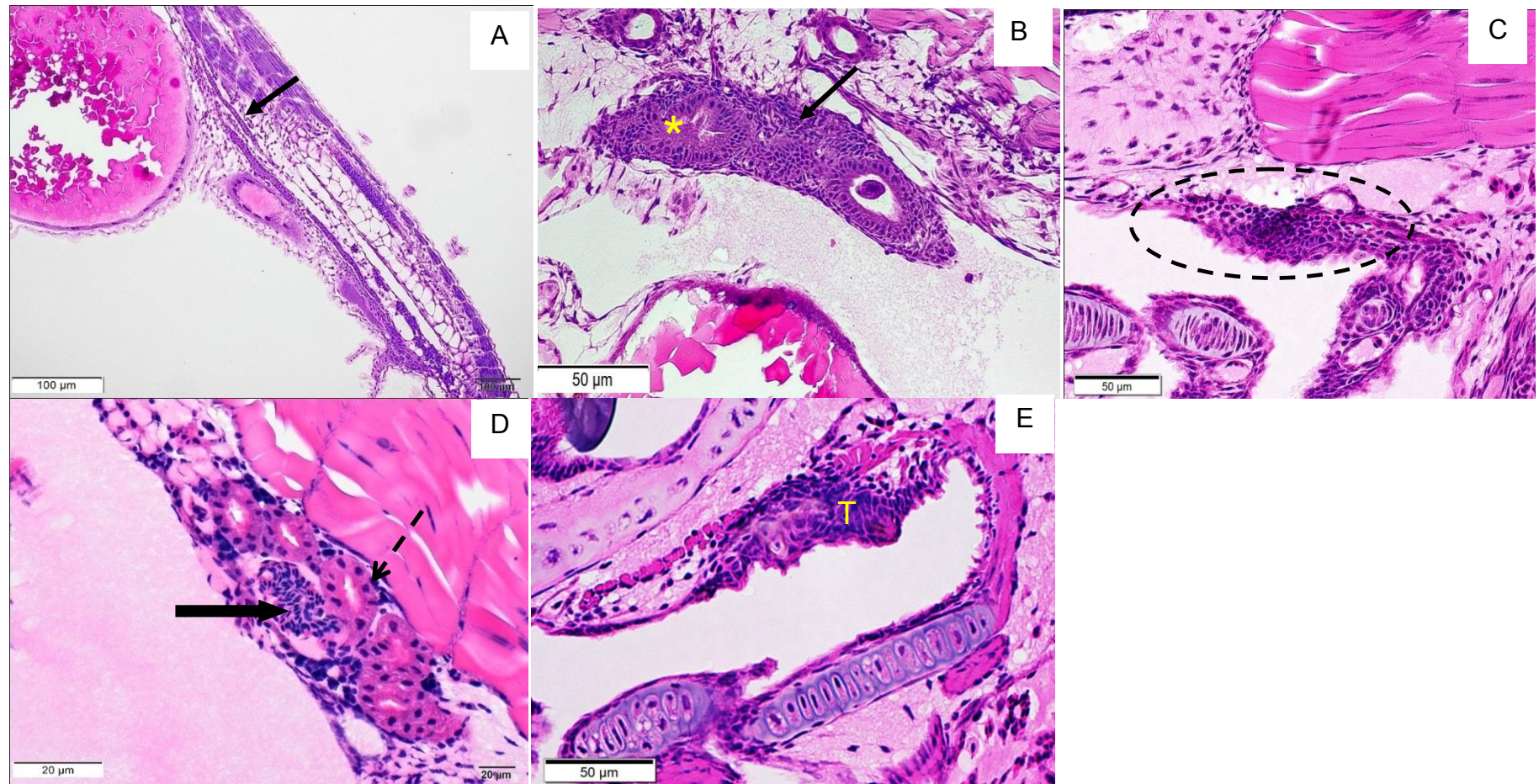
Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 5**

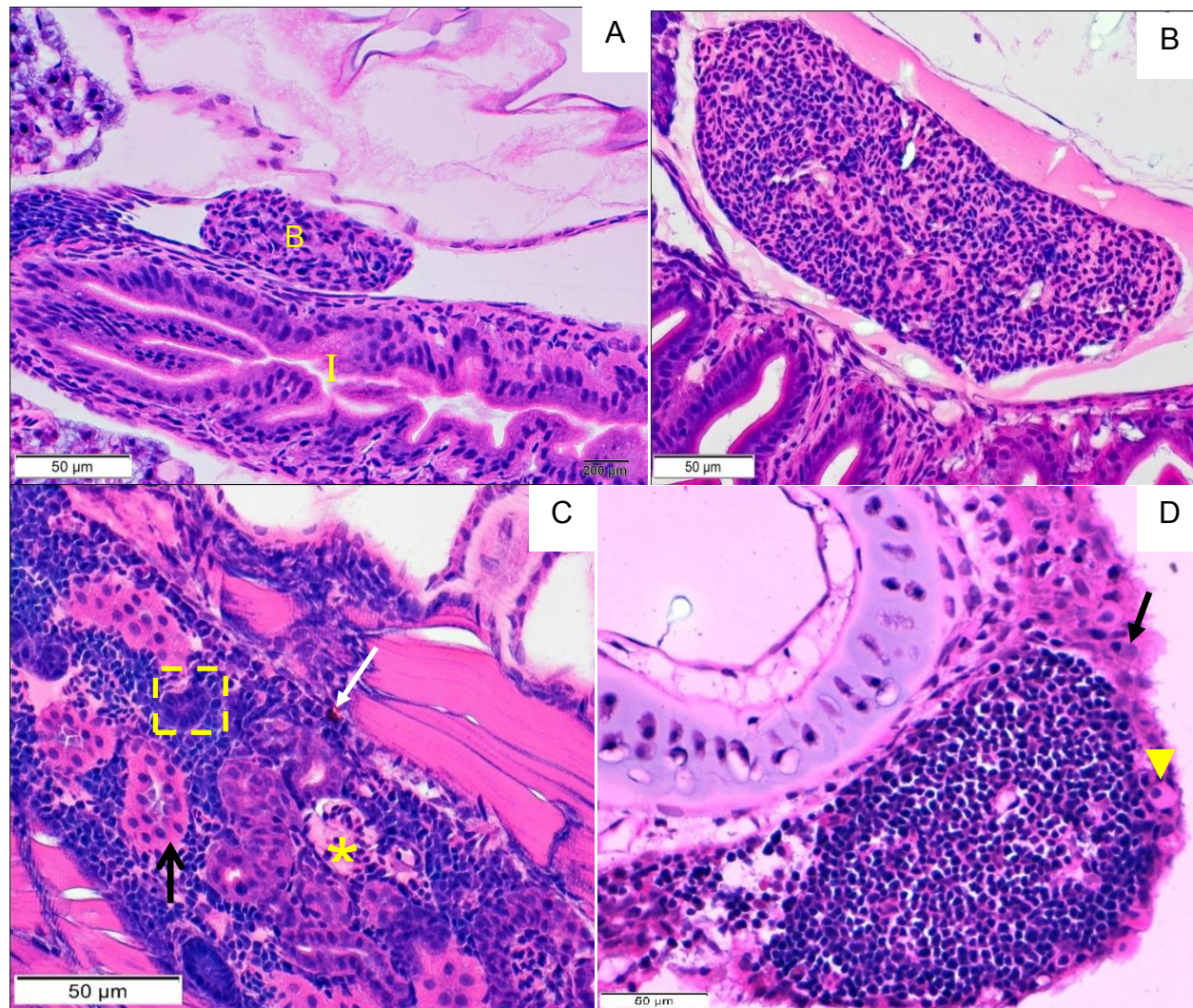
| Tempo de exposição<br>ao ar <sup>1</sup> (min) | A           |           | TT            |              |
|--|-------------|-----------|---------------|--------------|
|  | A           | TP        | A             | TT           |
| 1  | 100         | 100       | 100           | 100          |
| 3  | 100         | 100       | 100           | 100          |
| 5  | 100         | 100       | 100           | 100          |
| 7  | 94 ± 5,44 A | 82±8,36 B | 93,33± 5,77 A | 96,66±5,77 A |
| 20   | 0           | 0         | 0             | 0            |

**Figura1**

**Figura 2**



**Figura 3**





**Figura 4**

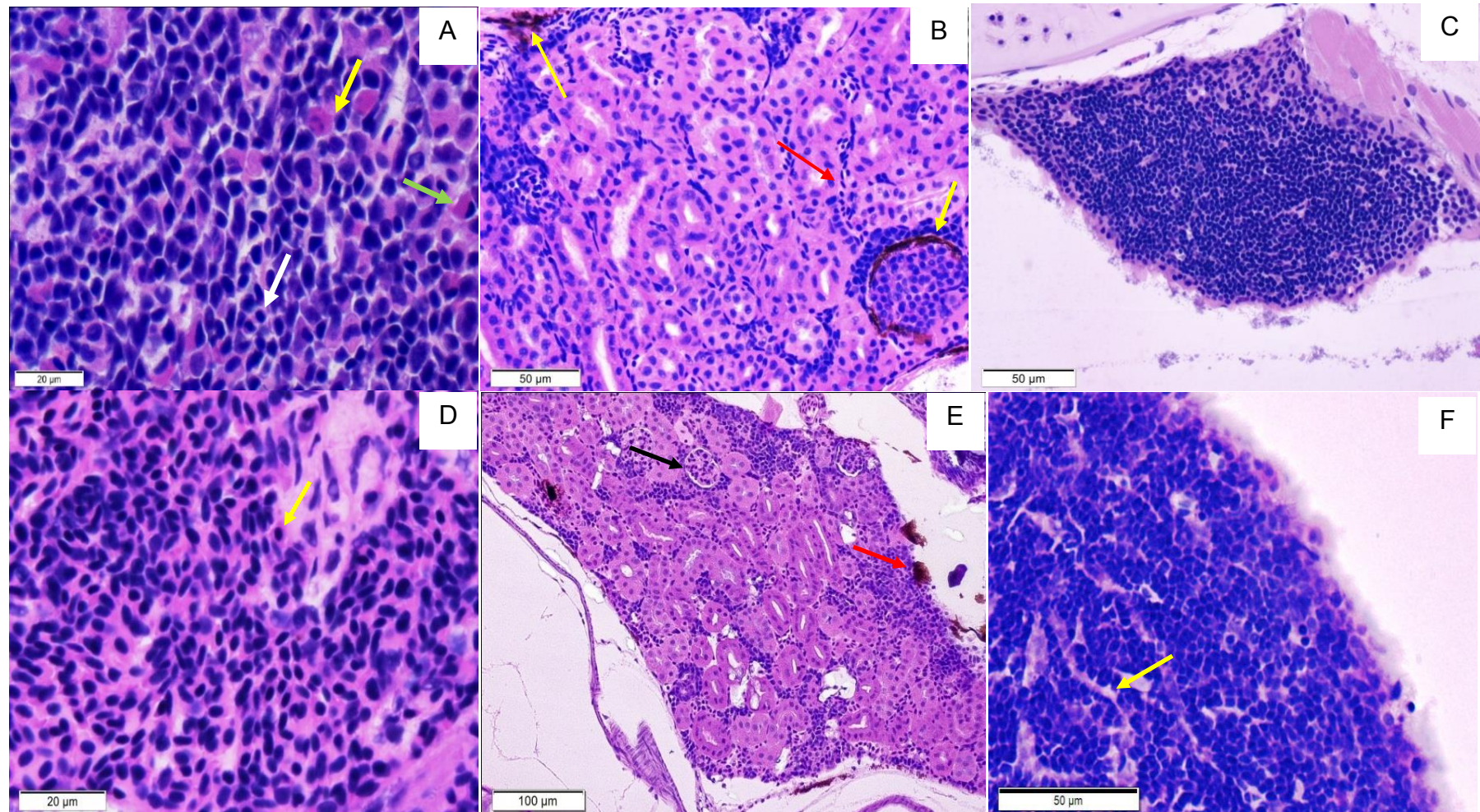


Figura 5

