



***Ontogenia do sistema imunitário de corvina  
(Argyrosomus regius) a diferentes temperaturas***

Damiana Marques Pires

2018



***Ontogenia do sistema imunitário de corvina  
(Argyrosomus regius) a diferentes temperaturas***

Damiana Marques Pires

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia dos  
Recursos Marinhos

Relatório de Estágio realizado sob a orientação da Doutora Florbela Soares e  
coorientação da Professora Especialista Teresa Baptista



Título: Ontogenia do sistema imunitário de corvina (*Argyrosomus regius*) a diferentes temperaturas

Copyright © Damiana Marques Pires

Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche

Instituto Politécnico de Leiria

2018

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Página deixada intencionalmente em branco

## **Agradecimentos**

À Professora Especialista Teresa Baptista pelo apoio demonstrado a partir do momento em que decidi optar por realizar um estágio na Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), depois na nossa conversa soube que tinha tomado a decisão certa, por ter aceite a orientação desde trabalho e pela sua disponibilidade ao longo deste percurso.

À Doutora Florbela Soares, da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), por ter aceite a orientação desde trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pelo seu apoio e pela disponibilidade que mostrou ao longo deste percurso, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Doutor Pedro Pousão-Ferreira, responsável pela Estação de Piscicultura de Olhão (EPPO), pela oportunidade que me deu para a concretização deste trabalho nas suas instalações.

À Margarida Gamboa, da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO), pela pessoa que demonstrou ser, por todos os conhecimentos que me transmitiu, pelo seu apoio incondicional e pela sua presença longo do meu percurso. O seu profissionalismo, a sua experiência e ajuda foram essenciais o desenvolvimento desde trabalho.

A toda a equipa da EPPO pela forma calorosa como me receberam e integraram, pela simpatia, pela disponibilidade para ajudar e transmitir conhecimento. O espírito de equipa, a camaradagem e a boa disposição presenciada na EPPO confirmaram que tomei a decisão certa. Um agradecimento ao Ivo Monteiro por demonstrar disponibilidade em ajudar na adaptação à cidade de Olhão. À Sara Castanho e à Anaísa Silva, por se mostrarem sempre disponíveis para ensinar, aconselhar e ajudar. À Marisa Barata por estar sempre pronta a ajudar e apoiar. Agradeço a todos, os trabalhadores da EPPO, que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento quer à nível profissional quer à nível pessoal.

À Paula Moura, do Centro de Olhão – Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), por me ter recebido no seu laboratório de histologia, pela sua disponibilidade que foi fundamental para a realização deste trabalho e pela sua ajuda durante este período.

A todos os professores da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar que contribuíram para a minha formação académica e pessoal, ao longo destes 5 anos. Um agradecimento à Professora Susana Mendes pela disponibilidade e ajuda demonstrada.

À Catarina Almeida, por partilhar esta experiência incrível comigo, pelo seu apoio nos momentos mais difíceis, pela boa disposição, por toda ajuda durante o meu percurso e por todos os momentos de diversão.

Às minhas amigas Daniela Batista, Daniela Silva, Adriana Januário, Filipa Neto pelas pessoas que são, pelo vosso apoio incondicional desde que nos conhecemos, por acreditarem em mim, pelos momentos bons que me proporcionaram, e apesar dos quilómetros por estarem sempre presentes.

Aos meus Pais, Anabela e Fernando, por serem os meus pilares, por me incentivarem a concretizar e a lutar pelos meus sonhos, por me apoiarem e darem força nos momentos difíceis e por estarem sempre presentes. Sem eles não teria chegado até aqui!

Aos meus avós, Maria, Joaquim, Rosélia e João, por todo apoio e pela preocupação.

Aos meus tios, Joaquim, Isabel e João, pela presença e por estarem sempre disponíveis em tudo o que precisasse.

À minha afilhada Constança pela boa disposição, pelo carinho e pela motivação que me dava para continuar e mostrar-lhe que é possível realizar os nossos sonhos!

A todas as pessoas que de alguma forma se cruzaram no meu caminho e que estiveram envolvidas neste percurso.

Um obrigado muito especial!

## Abstract

*Argyrosomus regius* is an emergent specie in aquaculture with limited knowledge of the timing of appearance and development of its immune system during ontogeny development, important to prevent disease outbreaks. The first step is to determine the appearance of the lymphoid organs, so that prophylactic measures can be applied, thus individuals acquire resistance instead of tolerance. This study evaluated the appearance of lymphoid organs in meagre larvae reared at two different temperatures ( $15\pm 0,7$  and  $18\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). The larvae were obtained from a natural spawn of F1 meagre broodstock maintained in the IPMA's (Portuguese Institute for the Sea and Atmosphere) Aquaculture research station (EPPO). The larval rearing was performed in cylindroconical tanks, in duplicate with an initial density of 26 larvae  $\text{L}^{-1}$ . The photoperiod was 14h-10h light-dark and the water renewal started at  $15\%.\text{h}^{-1}$  increasing up to  $40\%.\text{h}^{-1}$  with larval growth and development in an open system. The green water method was applied with a mix of two microalgae, *Nannochloropsis oculata* (No) and *Isochrysis galbana* (Tiso). From 3 days post hatching (DPH) to 10 DPH, the larvae were fed with rotifers (*Brachionus* spp.). *Artemia* was provided since 8 DPH and the inert feed was introduced at 9 DPH. Both, rotifers and *Artemia* were enriched with RedPepper® (Bernaqua TM) before provided. Larvae samples were collected daily for total length (mm), dry weight (mg) and histology. After 20 DPH, larvae presented a higher total length and dry weight ( $6,67\pm 0,56\text{mm}$ ;  $0,56\pm 0,06\text{mg}$ ) in the  $18^{\circ}\text{C}$  treatment compared with the larvae from  $15^{\circ}\text{C}$  treatment ( $4,77\pm 0,38\text{mm}$ ;  $0,12\pm 0,04\text{mg}$ ). The appearance sequence of lymphoid organs was as follows: head kidney (0 DAE), spleen (6 DAE) and thymus (8 DAE) at both rearing temperatures. So, the temperature tested affect the growth of larvae but did not influence the appearance of lymphoid organs, head kidney, spleen and thymus.

**Key-words:** aquaculture, marine fish larvae, immune system, head kidney, thymus, spleen

Página deixada intencionalmente em branco

## Resumo

*Argyrosomus regius* é uma espécie emergente em aquacultura com conhecimento limitado do tempo de aparecimento e desenvolvimento de seu sistema imunológico durante o desenvolvimento ontogênico, o que é importante para prevenir surtos de doenças. Assim, o primeiro passo é determinar o aparecimento dos órgãos linfáticos, de modo a que possam ser aplicadas medidas profiláticas, para que os indivíduos adquiram resistência ao invés de tolerância. Este estudo avaliou o aparecimento de órgãos linfáticos em larvas de corvina cultivadas a duas temperaturas diferentes ( $15 \pm 0,7$  e  $18 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ). As larvas foram obtidas a partir de reprodutores F1, mantidos na estação de Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) pertencente ao IPMA (Instituto Português do Mar e Atmosfera). O cultivo larvar foi realizado em tanques cilíndricos, em duplicados, com densidade inicial de 26 larvas  $\text{L}^{-1}$ . O fotoperíodo foi de 14h-10h dia-noite e a renovação da água começou em  $15\%.\text{h}^{-1}$ , aumentando para  $40\%.\text{h}^{-1}$  em sistema aberto. Também foi aplicado o método da água verde adicionando uma mistura de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* (No) e *Isochrysis galbana* (Tiso). Dos 3 dias após a eclosão (DAE) até 10 DAE, as larvas foram alimentadas com rotíferos (*Brachionus* spp.). A *artemia* sp. foi fornecida desde 8 DAE e a alimentação inerte foi introduzida a 9 DAE. Ambos, rotíferos e Artémia, foram enriquecidos com RedPepper® (Bernaqua TM) antes de serem fornecidos às larvas. A amostragem larvar foi realizada diariamente para biometria (comprimento total (mm) e peso seco (mg)) e histologia. Aos 20 DAE as larvas apresentaram maior comprimento total e peso seco ( $6,67 \pm 0,56\text{mm}$ ;  $0,56 \pm 0,06\text{mg}$ ) no tratamento a  $18^\circ\text{C}$  em comparação com as larvas do tratamento a  $15^\circ\text{C}$  ( $4,77 \pm 0,38\text{ mm}$ ;  $0,12 \pm 0,04\text{mg}$ ). Em relação ao aparecimento dos órgãos linfáticos, a sequência do seu aparecimento foi a seguinte: rim anterior (0 DAE), baço (6 DAE) e timo (8 DAE) para ambas as temperaturas. Assim, conclui-se que a temperatura não influenciou o aparecimento dos órgãos linfáticos, no entanto afetou o crescimento das larvas.

**Palavras-Chave:** aquacultura, larvas de peixes marinhos, sistema imune, rim anterior, timo, baço

Página deixada intencionalmente em branco

# Índice Geral

Abstract.....	VII
Resumo.....	IX
Índice Geral.....	XI
Lista de Figuras.....	XIII
Lista de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas.....	XVII
1. Introdução geral.....	1
1.1 <i>Argyrosomus regius</i> .....	3
1.2 Estação Piloto de Piscicultura de Olhão.....	4
2. Revisão da Literatura.....	5
2.1 Sistema imunitário dos peixes.....	5
2.1.1. Sistema imune inato.....	5
2.1.2. Sistema imune adaptativo.....	6
2.2. Órgãos do sistema imunológico.....	7
2.2.1. Rim anterior.....	8
2.2.2. Timo.....	9
2.2.3. Baço.....	10
3. Objetivo.....	13
4. Metodologias.....	15
4.1 . Obtenção de ovos.....	15
4.1.1 Incubação de ovos.....	16
4.2 Cultivo larvar.....	16
4.2.1 Método da “água verde”.....	17
4.2.2. Alimentação.....	18
4.3 Procedimento laboratorial.....	19
4.3.1. Amostragem larvar.....	19
4.3.2. Histologia.....	19

4.3.2.1. Desidratação e Impregnação em parafina.....	20
4.3.2.2. Microtomia dos blocos de parafina.....	21
4.3.2.3. Coloração dos tecidos.....	22
4.3.2.4 Observação microscópica das lâminas .....	23
4.4. Análise estatística.....	23
5. Resultados.....	25
5.1 Biometria das larvas de <i>Argyrosomus regius</i> .....	25
5.2 Ontogenia dos órgãos linfáticos em <i>Argyrosomus regius</i> .....	26
6. Discussão .....	31
6.1 Crescimento de larvas de <i>Argyrosomus regius</i> .....	31
6.2 Aparecimento e desenvolvimento dos órgãos linfáticos .....	33
6.2.1 Rim anterior .....	36
6.2.2. Timo.....	38
6.2.3. Baço .....	39
7. Conclusão e Perspetivas Futuras .....	43
8. Referências Bibliograficas.....	45
Anexos .....	51

## Lista de Figuras

Figura 1 – Exemplar da espécie <i>Argyrosomus regius</i> . (Fonte IPMA).....	3
Figura 2 – Instalações da EPPO.....	4
Figura 3 – Coletor de ovos.....	15
Figura 4 – Ovos viáveis de <i>Argyrosomus regius</i> .....	15
Figura 5 – Incubadora onde foram colocados os ovos viáveis (tanque cilindro-cônico com capacidade para 200L) .....	16
Figura 6 – Tanques de cultivo usados no ensaio.....	16
Figura 7 – Adição do mix de duas microalgas, <i>Nannochloropsis oculata</i> (No) e <i>Isochrysis galbana</i> (Tiso) nos tanques de cultivo.....	18
Figura 8 – Esquema do regime alimentar utilizado durante o cultivo larvar de corvina ( <i>Argyrosomus regius</i> ).....	18
Figura 9 – Aparelho onde foram realizadas a medição do comprimento total.....	19
Figura 10– Balança de precisão onde foram realizadas as pesagens das larvas.....	19
Figura 11 – Cesta com as cassetes histológicas (à esquerda); processador de tecidos (Processador Leica TP 1020, à direita) .....	20
Figura 12 – Dispensador de parafina.....	21
Figura 13 – Blocos para microtomia.....	21
Figura 14 – Micrótomo utilizado para realizar os cortes com uma espessura de 4µm.....	21
Figura 15 – Banho maria onde foram colocadas as secções finas obtidas .....	21
Figura16 – Procedimento do método de colocação Hematoxilina e Eosina (H&E) .....	22

Figura 17 – Preparação definitiva dos tecidos: adição do meio de montagem sobre a lâmina (à esquerda) e colocação da lamela por cima dos tecidos (à direita) ..... 23

Figura 18 – Crescimento das larvas de *Argyrosomus regius* a diferentes temperaturas. A) Comprimento total (mm) ao longo dos DAE quando comparadas as duas temperaturas. B) Peso seco (mg) ao longo dos DAE quando comparadas as duas temperaturas. Os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (*t-student*, *p-value* <0,05)..... 26

Figura 19 – Morfologia e desenvolvimento do rim anterior em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. A) 0 DAE: aparecimento do rim anterior (RA), células hemapoieticas dispersas, 100x. B) 2 DAE: Rim anterior, aparecimento dos primeiros túbulos renais, 100x. Aos 12 DAE, o aspeto do rim anterior na temperatura de 15 ° e 18°C, (C) e (D) respetivamente, 400x; Aos 22 DAE, o rim anterior apresenta um menor número de túbulos renais a 15°C (E) em relação ao número de túbulos renais observados a 18°C (F), 400x; Abreviaturas: N – notocorda; RA - rim anterior; RV- reserva vitelina..... 27

Figura 20 – Morfologia e desenvolvimento do timo em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. Aparecimento do timo ao 8 DAE em ambas as temperaturas, 15° e 18°C, A e B, respetivamente, 400x. O timo localiza-se próximo do rim anterior (RA), da cavidade branquial (CB) e da cavidade do ouvido interno (COI). Ao 13 DAE, o timo apresentava uma morfologia semelhante em ambas as temperaturas, C (15°C) e D (18°C), 400x. Aos 22 DAE, já é possível observar o timo encapsulado em ambas as temperaturas, E e F. Abreviaturas: CB– cavidade branquial; COI – cavidade do ouvido interno; RA – rim anterior; T – timo..... 28

Figura 21 – Morfologia e desenvolvimento do baço em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. Ao 6 DAE aparecimento do baço A e B 15° e 18°C, respetivamente, 400x; Aos 12 DAE, o baço apresenta uma forma circular em ambas temperaturas, 15°C (C) 100x, 18°C (D) 400x; Aos 22 DAE, o baço é menor na temperatura de 15°C (E) em comparação na temperatura 18°C (F), 400x.; Abreviaturas: B – baço; F- fígado; I – intestino; P- pâncreas. .... 29

Figura 22 – Larvas de *Argyrosomus regius* aos 22 DAE. A (15°C) e B (18°C) ..... 31

## **Lista de Tabelas**

Tabela I – Número de larvas de corvina recolhidas durante o ensaio experimental para histologia..... 20

Tabela II - Aparecimento dos órgãos linfáticos, rim anterior, timo e baço, em diferentes espécies de peixes..... 33

Página deixada intencionalmente em branco

## Lista de Abreviaturas

°C – Graus celsius

% - Percentagem

± - Mais ou menos

µm – Micrómetros

h – Hora(s)

L – Litros

ml – Milímetros

mm- Milímetros

B – Baço

CB – Cavidade branquial

COI – Cavidade do ouvido interno

CRP - Proteína C-reativa

DAE – Dias após a eclosão

DP – Desvio Padrão

DPX – Meio de montagem

dpe – Dias pré-eclosão

EPPO – Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

FAO – Organização Alimentar e Agrícola das Nações Unidas

Fig. – Figura

H & E – Hematoxilina e Eosina

I – Intestino

IFN – Interferão

Ig – Imunoglobulina(s)

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

MALT – Tecido linfático associado à mucosa

Nk – *Natural killer*

No – *Nannochloropsis oculata*

P – Pâncreas

PBS – Phosphate buffered saline

RA – Rim anterior

T – Timo

Tiso – *Isochrysis galbana*

Tr – Túbulos renais

Página deixada intencionalmente em branco

## **1. Introdução geral**

Ao longo dos últimos 40 anos, o setor global de aquacultura tem crescido de forma contínua, e atualmente, a nível mundial na produção de alimentos é dos setores com maior crescimento (Carbone e Faggio, 2016). Através da aquacultura, a produção global de peixe para fins alimentares foi de 73,8 milhões de toneladas em 2014, e a produção total, incluindo plantas aquáticas, foi de 101,1 milhões de toneladas (Nadarajah e Flaaten, 2017). E em 2016, a produção mundial de aquacultura incluiu 80,0 milhões de toneladas de peixe para fins alimentares e 30,1 milhões de toneladas de plantas aquáticas, bem como 37 900 toneladas de produtos não alimentares (FAO, 2018).

Devido ao rápido crescimento desta indústria, as práticas intensivas e semi-intensivas de produção causaram um aumento dos surtos de doenças resultando em perdas parcial ou total da produção de peixe. Existem diversos fatores, como elevadas densidades, manejo, temperatura, baixa qualidade da água e má nutrição que são responsáveis por provocar stress, o que leva à imunossupressão dos peixes, consequentemente aumenta a suscetibilidade a doenças infecciosas (Awad e Awaad, 2017), resultando em elevadas taxas de mortalidade, que representam uma grande restrição para o progresso da aquacultura (Carbone e Faggio, 2016; Houston, 2017; Uribe et al., 2011).

Em aquacultura, uma das principais etapas é a obtenção de ovos e subsequente desenvolvimento larvar (Cordero et al., 2016), contudo tem sido registada uma taxa de mortalidade significativa nesta fase, dado que os peixes são organismos com vida livre desde os estádios iniciais de desenvolvimento, encontrando-se expostos a numerosos agentes patogénicos, mesmo antes do desenvolvimento completo do seu sistema imunitário (Ferrareso et al., 2016; Han et al., 2014; Parker et al., 2012). Durante o desenvolvimento larvar ocorrem uma série de eventos que são considerados períodos críticos, como a abertura da boca e do ânus e a introdução da alimentação exógena, que aumenta a densidade de matéria orgânica, sujeitando as larvas a uma carga bacteriana significativa, constituindo um potencial vetor para transmissão de doenças. Sabe-se que à medida que a microbiota intestinal é estabelecida, as interações entre o desenvolvimento do sistema imunitário e o ambiente intensificam-se, aumentando dramaticamente a necessidade de mecanismos de defesa contra patógenos (Arula et al., 2015; Castro et al., 2015; Patel et al., 2009; Shields, 2001).

Especialmente durante os estádios iniciais de desenvolvimento, os peixes dependem do seu sistema imune inato, que representa a primeira linha de defesa contra

qualquer dano tecidual ou interação patogénica, desempenhado um papel fundamental em contrariar o estabelecimento de uma infeção (Cecchini et al., 2013), no entanto, estes mecanismos de defesa nem sempre são suficientes para a sobrevivência dos organismos. Desta forma surge a necessidade de estabelecer medidas profiláticas adequadas, como a vacinação e o uso de imunostimulantes e probióticos. Estas estratégias de controlo de doenças têm sido consideradas ideais e efetivas promovendo a sustentabilidade em aquacultura (Lazado et al., 2014).

A vacinação dos peixes é uma das formas mais utilizadas para controlar as doenças, e em estádios iniciais possui vantagens económicas, tais como redução das taxas de mortalidade, menor quantidade de vacina, para além de ser um procedimento de fácil execução. No entanto é necessário ter em conta o estado imunocompetente dos peixes, pois o desenvolvimento de vacinas eficazes depende principalmente da capacidade dos peixes ativarem o seu sistema imune específico e de sintetizarem anticorpos e células de memória. Por consequente, uma estimulação imune antes que o peixe seja capaz de construir uma resposta imune eficaz pode induzir tolerância, em vez de proteção (Dos Santos et al., 2000; Patel et al., 2009).

Por outro lado, o uso de imunostimulantes, como suplementos dietéticos pode melhorar o crescimento, a eficiência alimentar e/ou a resistência a doenças (Vallejos-Vidal et al., 2016). A imunomodulação de larvas de peixe tem sido proposta como um método para melhorar a sobrevivência larvar, aumentando as respostas inatas dos animais em desenvolvimento até a sua resposta imune adaptativa estar suficientemente desenvolvida para montar uma resposta efetiva ao patógeno. Contudo, tem suscitado a preocupação de imunomodular o organismo antes do seu sistema imunológico estar completamente formado, pois pode afetar negativamente o desenvolvimento de uma resposta imune normal (Bricknell e Dalmo, 2005). Neste contexto, a idade em que a competência imune é adquirida torna-se um fator importante para determinar em que estágio de desenvolvimento o organismo é mais vulnerável e qual o tipo de tratamento a administrar mais eficaz, se necessário (Watts et al., 2003).

Deste modo para uma produção sustentável e livre de doenças é importante desenvolver ferramentas analíticas, bem como compreender o sistema imunológico e os mecanismos de defesa contra doenças comuns associadas ao cultivo intensivo de algumas espécies economicamente importantes. Estas pesquisas auxiliam a definir as condições ideais para a manutenção de peixes imunocompetentes (Bilal et al., 2016; Secombes e Wang, 2012; Randelli et al., 2008).

## 1.1 *Argyrosomus regius*

A espécie *Argyrosomus regius* (Fig.1) designa-se por corvina (nome comum), é um peixe teleósteo da família Sciaenidae distribuída no Mar Mediterrâneo, Mar Negro e na costa Atlântica da Europa, desde da Noruega até ao Congo (Papadakis et al., 2018; Gonzalez-Quirós et al., 2011). No meio natural, a corvina habita em águas costeiras, podendo alcançar uma profundidade entre 15 a 200m (Shabana et al., 2012; El-Shebly et al., 2007). Durante a época de reprodução, como é uma espécie anádroma, os adultos aproximam-se das zonas costeiras em meados de abril e no final de maio entram nos estuários a fim de efetuarem a desova (Monfort, 2010). As áreas importantes para a desova são o estuário do rio Gironde, o golfo da Biscaia, em França, o rio Tejo, Portugal e o rio Guadiana, no sul de Espanha e Portugal (Duncan et al., 2013). É um animal muito voraz, com hábitos alimentares baseados em espécies de peixes menores (famílias Clupeidae e Mugilidae) e crustáceos (Millán-Cubillo et al., 2016). Em estado selvagem, os indivíduos podem atingir mais de 50 kg tendo sido reportado um peso máximo de 103 kg e comprimento total de 182 cm (El-Shebly et al., 2007; Papadakis et al., 2013).



Figura 1- Exemplar da espécie *Argyrosomus regius* (Fonte IPMA).

Na última década, a produção de corvina aumentou rapidamente (Mylonas et al., 2015), especialmente nos países mediterrâneos, onde são cultivadas em lagoas de águas salobras, no Egipto, e em instalações *off-shore*, em Espanha, Turquia, Grécia, Itália e França (Arechavala-Lopez et al., 2017) e em tanques de terra batida em Portugal. *Argyrosomus regius* é considerada uma espécie emergente em aquacultura, que possui potencial para se tornar uma das principais espécies cultivadas na região do mediterrâneo devido à sua capacidade de adaptação as condições de cativeiro, alta taxa de fecundidade, impressionante taxa de crescimento comparada à de dourada (*Sparus aurata*) e robalo (*Dicentrarchus labrax*), excelente sabor, textura firme, elevado preço comercial. Para além disso é adequada para processamento, podendo ser transformada em filetes e porções frescas ou congeladas (Saavedra et al., 2017; Solovyev et al., 2016). E para consumo humano, tendo em conta que contém uma alta percentagem de ácidos gordos polinsaturados nos tecidos comestíveis com baixo nível de gordura total mesentérica e muscular (Mansour et al., 2017).

No entanto, na corvina a presença de vários parasitas tem sido relatada e algumas bactérias têm sido associadas a surtos de doenças (Soares et al., 2018), que se encontram entre as várias ameaças à produção sustentável, sendo das mais proeminentes e potencialmente devastadoras. Devido à intensificação do cultivo desta espécie é fundamental que uma maior compreensão da resposta imunológica seja alcançada para auxiliar o desenvolvimento de estratégias efetivas para prevenir ou controlar surtos de doenças (Milne et al., 2018).

## 1.2 Estação Piloto de Piscicultura de Olhão

A Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) é uma infraestrutura única no país que pertence ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA) (Fig.2). Foi concebida com o objetivo de realizar investigação, desenvolvimento e demonstração experimental à escala piloto. As suas instalações localizam-se no Parque Natural da Ria Formosa em Marim ocupando cerca de 7ha.

Esta unidade é composta por uma zona de maternidade, uma zona de pré-engorda e uma área de engorda em tanques de terra, em sistemas de monocultura, policultura ou multitrófico.

Na EPPO são realizados ensaios de reprodução, desenvolvimento larvar e engorda de diversas espécies com especial destaque para a dourada (*Sparus aurata*) e o robalo (*Dicentrarchus labrax*) bem como para novas espécies tais como o sargo (*Diplodus sargus*; *Diplodus vulgaris*; *Diplodus cervinus*), o mero (*Epinephelus marginatus*), o linguado (*Solea senegalensis*), a corvina (*Argyrosomus regius*) e mais recentemente a sardinha (*Sardina pilchardus*) e ouriço-do-mar (*Paracentrotus lividus*). Também são concebidos estudos ao nível da fisiologia, da nutrição, da patologia e ensaios de engorda de peixes em policultura de várias espécies e em sistemas multitróficos.



Figura 2 – Instalações da EPPO.

## **2. Revisão da Literatura**

### **2.1 Sistema imunitário dos peixes**

No ambiente aquático, os peixes estão em constante interação com uma ampla gama de microrganismos patogênicos e não patogênicos, o que levou a evolução dos seus sistemas imunes defensivos, que consistem numa variedade de moléculas, células e tecidos. Embora esses sistemas funcionem de formas distintas em diferentes espécies, qualquer sistema imunológico é constituído por estruturas biológicas e processos que detetam e distinguem uma grande variedade de patógenos, desde vírus a parasitas, do próprio tecido saudável do organismo conferindo assim proteção contra doenças (Subramanian et al., 2007; Rauta et a., 2012).

Geralmente, o sistema imunológico encontra-se dividido em sistema imune inato (não-específico) e em adaptativo (específico). Ambos os sistemas incluem respostas mediadas por células e componentes humorais. Como o próprio nome indica, as respostas celulares dependem do desenvolvimento direto de células que podem fagocitar ou usar outras formas para atacar os patógenos. Por outro lado, a componente humoral é frequentemente restrita apenas às respostas que envolvem anticorpos, mas num sentido mais amplo, pode incluir as respostas de quaisquer moléculas defensivas que atuem através de fluídos corporais, como o sangue, os fluídos intersticiais ou as secreções exócrinas. Estes sistemas podem funcionar sequencialmente, ou seja, o sistema inato funciona como a primeira linha de defesa, defendendo ou mantendo ativos mecanismos contra agentes patogênicos até que uma resposta imune adaptativa seja desenvolvida (Magnadóttir, 2005; Bone e Moore, 2008). Desta forma, as respostas inatas estão na vanguarda da defesa imunológica, sendo um fator crucial na resistência às doenças, enquanto as respostas adaptativas são comumente retardadas, no entanto são essenciais para a imunidade duradoura e um fator chave para uma vacinação bem-sucedida (Secombes e Wang, 2012).

#### **2.1.1. Sistema imune inato**

O sistema inato é o mecanismo imunitário mais antigo que defende o indivíduo contra infeções mediadas por outros organismos de forma inespecífica. Isso significa que as células deste sistema reconhecem e respondem aos agentes patogênicos de forma genérica (Rauta et al., 2012). Comumente é dividido em três componentes: (1) barreiras físico-químicas e/ou barreiras epiteliais e/ou mucosas, tais como escamas, superfície epitelial (em brânquias, pele e intestino) com muco segregado, (2) parâmetros humorais como células, secreções de complemento, proteína C-reativa (CRP),

interferão (IFN), lisozima, transferrina, lectinas, péptidos antimicrobianos e (3) componentes celulares tais como células citotóxicas não específicas (ou células *Natural killer*, NK), monócitos/ macrófagos, trombócitos, granulócitos (ou neutrófilos) e linfócitos (Kum e Sekkin, 2011; Magnadóttir, 2006; Swain e Nayak, 2009; Uribe et al., 2011)

Segundo Tafalla et al. (2013), os peixes possuem um sistema imune inato fortemente desenvolvido que consegue lidar com diversos agentes infecciosos, ajudando a erradicar vírus, bactérias e parasitas. Sabe-se que este sistema atua mais rápido que o sistema específico, no entanto não se torna mais efetivo após a repetida exposição ao mesmo agente patogénico (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Bone e Moore, 2008).

Nos peixes, a resposta inata é considerada essencial no combate contra os patógenos face às limitações do seu sistema adaptativo, à sua natureza poiquilotérmica, ao seu repertório de anticorpos limitado e à lenta proliferação, maturação e memória dos seus linfócitos (Uribe et al., 2011; Whyte, 2007). Desta forma, o sistema inato desempenha um papel fundamental em contrariar o estabelecimento da infeção, especialmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento, quando a imunidade adaptativa está longe de estar completamente desenvolvida (Cecchini et al., 2013).

### **2.1.2. Sistema imune adaptativo**

No entanto, muitos agentes infecciosos resistem aos mecanismos de defesa inata, e em seguida uma resposta imune adaptativa surge pela primeira vez (Tafalla et al., 2013). Ao contrário do sistema imune inato, o sistema imune específico necessita da presença de um antígeno, que é uma molécula ou célula estranha, responsável por desencadear uma resposta imune de proliferação de anticorpos específicos, seguida de uma resposta de memória imune. Os antígenos que entram no organismo são reconhecidos e processados pelo sistema inato por células apresentadoras de antígenos (APC), como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, para processar microrganismos em unidades moleculares (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). Assim, o sistema imune adaptativo é ativado pelas respostas imunes inatas, sendo capaz de reconhecer eficientemente patógenos específicos e criar memória imunológica (Awad e Awaad, 2016; Rauta et al., 2012). No entanto, a ativação do sistema imunitário adquirido é relativamente lenta, exigindo a seleção específica de recetores, proliferação celular e síntese proteica, contudo é de longa duração (Kum e Sekkin, 2011).

A resposta imune específica ocorre através de mecanismos que envolvem uma rede complexa de células, proteínas, genes e mensagens bioquímicas especializadas que fornecem os meios necessários para que o organismo responda especificamente

aos antígenos, com anticorpos e células efectoras de alta especificidade e afinidade (Uribe et al., 2011). Esta resposta é mediada por dois tipos de linfócitos, em que as células T são os componentes principais da imunidade mediada por células, enquanto que as células B são responsáveis pela produção de anticorpos que constituem elementos chave da imunidade humoral (Bone e Moore, 2008; Mashoof e Criscitiello, 2016).

Os anticorpos constituem uma classe de proteínas, também conhecida como imunoglobulinas (Ig) produzidas por células B em resposta a antígenos. Ao contrário de todas as outras proteínas do organismo, os genes que controlam a produção de anticorpos não são fixos, porém consistem em sequências de DNA que podem produzir proteínas com estruturas ligeiramente variáveis que lhes permitem responder a um número quase ilimitado de antígenos. Essa diferenciação ocorre antes da formação de células B, de modo que toda célula B produz o seu próprio anticorpo sem a necessidade de exposição a qualquer antígeno (Bone e Moore, 2008).

Nos peixes teleósteos existem três tipos de imunoglobulinas: IgM, IgD e IgT (no peixe zebra é denominada por IgZ). A IgM é a principal componente da imunidade sistêmica, também pode estar presente no muco. A IgT/Z é especializada nas respostas imunes da mucosa e está presente em baixas concentrações no soro. No entanto, o papel da IgD na imunidade dos peixes não foi totalmente elucidado, tendo sido sugerido que poderia funcionar como um recetor de ligação ao antígeno e desempenhar um papel nas respostas imunes como mediador da imunidade inata (Bilal et al., 2016; Ronneseth et al., 2015).

## **2.2. Órgãos do sistema imunológico**

As respostas imunes são mediadas por uma variedade de células e componentes humorais. Os leucócitos são comuns para todas as respostas imunes e incluem linfócitos (células T, células B, linfócitos granulares), fagócitos (fagócitos mononucleares, neutrófilos e eosinófilos) e células auxiliares (basófilos, mastócitos e plaquetas). Estas células são organizadas em tecidos e órgãos para desempenhar as suas funções de maneira mais eficaz. Estas estruturas são coletivamente referidas como sistema linfático, e são organizadas em órgãos discretamente encapsulados ou acumulações de tecido linfático difuso (Secombes e Wang, 2012).

Nos vertebrados superiores, o sistema imunológico consiste em órgãos linfáticos primários (produtores de linfócitos) e secundários (envolvidos na construção da resposta imune). O fígado fetal, o timo e a medula óssea constituem os órgãos linfáticos

primários, enquanto o baço, linfonodos e tecido linfático associado a mucosa (MALT) compreendem os órgãos linfáticos secundários. Contudo, nos peixes a organização dos órgãos linfáticos é ligeiramente diferente dos vertebrados (Castro e Tafalla, 2015). No entanto, os peixes e mamíferos apresentam algumas semelhanças e diferenças em relação à função imune (Tort et al., 2003). Considerando que estas diferenças são devidas aos compartimentos corporais e à organização celular, a maioria dos órgãos linfáticos secundários presentes nos mamíferos também é encontrada nos peixes, com a exceção dos nódulos linfáticos e da medula óssea (Kum e Sekkin, 2011; Rauta et., 2012).

Sabe-se que os peixes são um grupo heterogêneo de organismos e por isso existem diferenças morfológicas entre as diversas espécies. Desta forma, os órgãos linfáticos primários são o timo, o rim anterior ou prónefros para os peixes ósseos enquanto para os peixes cartilaginários são o órgão de Leyding e o órgão epigonal. Por outro lado, o baço, o rim e MALT constituem os órgãos linfáticos secundários (Castro e Tafalla, 2015).

### **2.2.1. Rim anterior**

Em peixes teleósteos, o rim é muitas vezes designado como tecido renal anterior ou rim anterior, sendo um órgão importante na imunidade e na hematopoiese, e por isso é considerado equivalente à medula óssea dos vertebrados (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014; Kum e Sekkin, 2011).

Este órgão é o local de diferenciação de células sanguíneas, assim como é responsável pelo desenvolvimento de respostas imunes precoces em embriões de peixes (Bone e Moore, 2008). Desde o início do desenvolvimento, todo rim está envolvido na produção de células do sistema imunológico e na resposta imune precoce. À medida que o peixe se desenvolve, o fluxo sanguíneo através do rim é lento e ocorre a exposição a antígenos. Por consequente parece haver uma concentração de centros de melanomacrófagos (MMC's), que consistem agregados de células reticulares, macrófagos, linfócitos e células plasmáticas, que podem estar envolvidos na captura de antígenos e podem desempenhar um papel na memória imunológica (Kum e Sekkin, 2011). Deste modo, o rim anterior assume funções hematopoiéticas e ao contrário, em vertebrados superiores é o principal órgão imune responsável pela fagocitose, processamento de antígenos, formação de IgM e memória imunológica através de MMC's (Tort et al., 2003).

Normalmente, o rim está localizado ventralmente através da coluna vertebral, estendendo-se desde da base do crânio ao eixo do corpo. A porção anterior do rim é geralmente bifurcada em dois lobos, não tem nefrônios e não assume uma função renal. Consiste num órgão bem innervado com funções reguladoras chave, sendo o órgão central para interações endócrinas e imunológicas e até conexões neuro-imuno-endócrinas. Por outro lado, o rim posterior possui uma combinação de tecido renal imunológico (Castro e Tafalla, 2015; Rauta et al., 2012).

Estruturalmente, o rim anterior é composto por uma rede de fibras reticulares que fornecem suporte ao tecido linfático, que são encontradas dispersas entre as células do sistema hematopoiético que revestem o retículo epitélio sinusoidal. As células reticulares desempenham um papel importante no fornecimento das interações necessárias para a função das células linfáticas e nas células endoteliais das sinusoides, que consiste no principal componente para a filtração do sangue, devido à sua capacidade de realizar endocitose (Uribe et al., 2011; Mokhtar, 2017).

### **2.2.2. Timo**

Em vertebrados, o timo é o local hematopoiético central para o desenvolvimento funcional de linfócitos T que atuam como principais agentes do sistema imune adaptativo (Ma et al., 2013). Estas células T estão envolvidas na rejeição aloenxerto, estimulação da fagocitose e produção de anticorpos pelas células B (Tort, 2003; Rauta et al., 2012).

Em teleósteos, o timo pode ser um órgão uni-, bi- ou trilobado, dependendo da espécie e encontra-se localizado abaixo do epitélio faríngeo na região dorso-lateral da câmara branquial. É composto por duas principais populações de células, as células epiteliais tímicas e os timócitos (principalmente células T). Juntamente com as células mesenquimais circundantes, as células epiteliais tímicas formam um ambiente epitelial para o suporte da diferenciação de células T (Castro e Tafalla, 2015; Kum e Sekkin, 2011, Ma et al., 2013). A estrutura que caracteriza o timo do peixe é uma cápsula fina que envolve o tecido linfático, basicamente pode ser considerado uma agregação de macrófagos que promovem a proliferação de células T (Uribe et al., 2011; Mokhtar, 2017).

A morfologia tímica é altamente variável em teleósteos, e em muitas espécies não é possível observar uma clara diferenciação entre o córtex e a medula encontrado em vertebrados superiores (Carbone e Faggio, 2016; Mokhtar, 2017).

É comum em vertebrados superiores, após a idade adulta, o timo reduzir de tamanho e ocorrer uma substituição por tecido adiposo, este processo é designado por involução. Sabe-se que este processo é dependente da idade, dado que em organismos jovens o timo é muito maior do que em adultos. Em peixes, a involução não é tão frequente, visto que é mais dependente de ciclos hormonais e variações sazonais do que da idade. E por isso em algumas espécies, o timo pode persistir durante toda a vida (Bone e Moore, 2008; Tort et al., 2003).

### **2.2.3. Baço**

Como um importante órgão imunológico secundário, o baço é o local de armazenamento e produção de eritrócitos (eritropoiese) assim como de destruição de células sanguíneas envelhecidas e afetadas. Todavia, o baço dos teleósteos contém células produtoras de anticorpos, sendo a principal fonte de imunoglobulinas. Por essa razão, este órgão desempenha um papel essencial na apresentação de antígenos e no início da resposta imune adaptativa. As suas principais funções incluem o desenvolvimento de células B e processamento de antígenos. Além disso, o baço de peixe atua como um segundo órgão linfático para filtrar patógenos veiculados pelo sangue constituindo o principal local de defesa contra agentes patogênicos. Desde modo, o baço é um órgão eminentemente adequado para avaliar respostas imunes e identificar genes relevantes para o sistema imune em peixes (Li et al., 2017; Qin et al., 2017). Aliás este órgão sozinho exerce uma função essencial na captura de antígenos, visto que os peixes não possuem linfonodos (Rauta et al., 2012).

Geralmente, o baço encontra-se localizado na cavidade peritoneal adjacente à parede intestinal. A sua estrutura em teleósteos é semelhante à encontrada em mamíferos, sendo constituído por vasos sanguíneos e diferenciado em polpa vermelha e polpa branca. Contudo nos peixes, a divisão entre a polpa vermelha e polpa branca não é organizada, no entanto é possível identificar cada polpa em diversas espécies (Mokhtar, 2017; Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). A polpa vermelha ocupa a maior parte do órgão e consiste numa rede celular reticular que suporta sinusoides e leucócitos, principalmente macrófagos e linfócitos. Enquanto a polpa branca é composta especialmente por células linfáticas que tipicamente envolvem vasos arteriais, centros de melanomacrófagos e elipsoides (Castro e Tafalla, 2015; Mokhtar, 2017).

Os melanomacrófagos são células imunes prevalentes no baço e possuem uma quantidade variável de pigmentos, incluindo melanina, hemossiderina, ceróide ou lipofuscina, localizada em vacúolos. Estes pigmentos têm a capacidade de absorver e

neutralizar radicais livres, iões carregados positivamente e outros agentes potencialmente tóxicos. Sabe-se que em peixes saudáveis, os melanomacrófagos são comuns no baço e no rim, e em algumas espécies no fígado. Porém em peixes cronicamente stressados verifica-se um elevado número de melanomacrófagos e um aumento das suas dimensões. No entanto, a idade dos indivíduos também influencia o aumento do tamanho e do número de melanomacrófagos (Mokhtar, 2017; Evans e Nowak, 2016).

Os elipsoides consistem em capilares especializados com paredes espessas que se abrem na polpa e resultam da divisão das arteríolas esplénicas. Ao longo das paredes, as células estão ativamente envolvidas na fagocitose de antígenos. Geralmente, os antígenos podem ser retidos por longos períodos de tempo sob a forma de anticorpos ou produtos metabólicos, o que tem um papel importante na memória imunológica (Kum e Sekkin, 2011; Uribe et al., 2011).

Página deixada intencionalmente em branco

### **3. Objetivo**

O presente trabalho teve como objetivo determinar o aparecimento dos órgãos linfáticos, o rim anterior, o timo e o baço, durante o desenvolvimento larvar da corvina, *Argyrosomus regius*, a duas temperaturas distintas ( $18 \pm 0,5$  e  $15 \pm 0,7^\circ\text{C}$ ). Constituindo assim o primeiro passo para futuramente controlar e prevenir surtos de doenças nesta espécie emergente em aquacultura.

De forma a alcançar o objetivo desde trabalho foram aplicadas técnicas de cultivo larvar descritas para esta espécie, desde da recolha dos ovos, a sua incubação e desenvolvimento até aos 22 dias após a eclosão (DAE). E para determinar o aparecimento dos órgãos imunes foi efetuada histologia.

Página deixada intencionalmente em branco

## 4. Metodologias

### 4.1. Obtenção de ovos

As larvas de corvina (*A. regius*) foram obtidas a partir de uma postura natural de reprodutores F1 mantidos em cativeiro nas instalações da Estação Piloto de Piscicultura de Olhão (EPPO) pertencente ao Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA).

Uma vez que o período de desova, ocorre maioritariamente de noite foram colocados coletores com uma malha de 500µm na saída de água dos tanques de reprodutores (Fig. 3), de forma a reter os ovos para se proceder à sua recolha de manhã.

Para quantificar e analisar a qualidade da postura obtida efetuou-se a concentração dos ovos num balde, deixou-se repousar para ocorrer a separação dos ovos por flutuabilidade (decantação). Efetuou-se a pesagem da fração de ovos viáveis (flutuam) e não viáveis (decantam), de modo a determinar:

- a) Total da postura (g) = ovos viáveis (g) + ovos inviáveis (g)
- b) Viabilidade da postura (%) = ovos viáveis (g)/ total de ovos (g).

A fração de ovos viáveis foi colocada num balde (5 L) com água do tanque e arejamento moderado. Posteriormente, foi recolhida uma pequena amostra aleatória de 30 a 50 ovos desta fração viável (Fig. 4), com o objetivo de analisar o estado de desenvolvimento embrionário.



Figura 3 – Coletor de ovos.

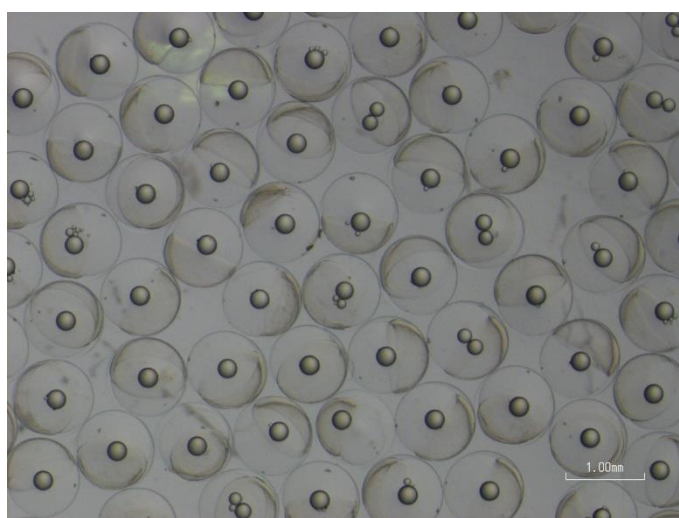


Figura 4 – Ovos viáveis de *Argyrosomus regius*.

#### 4.1.1 Incubação de ovos

Os ovos viáveis (100g) foram cuidadosamente transferidos para uma incubadora, que consiste num tanque cilindro-cônico, em fibra de vidro, com uma capacidade de 200 L<sup>-1</sup> (Fig.5). A incubadora recebe água filtrada e passada, através dos ultravioletas com temperatura ( $18\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) e luz (intensidade) controlada. O arejamento tinha um fluxo fraco (mais ou menos 3 bolhas na coluna de água) para evitar muita turbulência. Antes de transladar as larvas recém eclodidas para os tanques de ensaio, determinou-se a taxa de eclosão, e para isso verteu-se todo o material biológico da incubadora para um coletor. Depois as larvas retidas foram colocadas num balde de 10 L, tendo sido feitas 10 contagens do número de larvas eclodidas em 20 ml.



Figura 5 – Incubadora onde foram colocados os ovos viáveis (tanque cilindro-cônico com capacidade para 200L).

#### 4.2 Cultivo larvar

O ensaio foi realizado utilizando apenas uma postura. Após o procedimento para o cálculo da taxa de eclosão, as larvas foram distribuídas de forma homogênea por dois tratamentos diferentes utilizando uma densidade de 26 larvas L<sup>-1</sup>, em duplicados, testando duas temperaturas distintas, correspondendo  $15\pm 0,7$  e  $18\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .

Foram usados quatro tanques cilindro-cônicos, em fibra de vidro, com capacidade para 200 L e 600 L, funcionando como sistema aberto (Fig. 6). Na saída de água, estava colocado um filtro com uma malha que variou de 80, 150, 250 e 350  $\mu\text{m}$  durante o período do ensaio. O tamanho da malha do filtro era escolhido consoante o tamanho das larvas e do alimento fornecido. Inicialmente colocou-se um filtro de 150  $\mu\text{m}$ , uma vez que as larvas tinham tamanho suficiente, possuíam saco vitelino e gota lipídica pelo que não era necessário fornecer alimento.



Figura 6 – Tanques de cultivo usados no ensaio.

Após a introdução de alimento exógeno, o tamanho da malha do filtro foi alternado entre malhas de menores dimensões durante o dia, de forma a manter o alimento enriquecido no tanque. E malhas de maiores dimensões no período de noite para permitir a saída de

alimento que não era consumido, uma vez que perde as suas qualidades nutritivas além de começar a crescer impedindo a sua captura pelas larvas. Desta forma durante o período de alimentação com rotíferos, durante o dia era colocado um filtro de 80 µm e durante a noite era de 150 µm. Com a introdução da artémia e ração durante o dia passou-se a usar um filtro de 150 µm ou 250 µm conforme a quantidade de alimento disponível, e durante a noite era colocado um de 250 ou 350 µm.

Nos tanques, a renovação da água inicial foi de 15%.h<sup>-1</sup> aumentando para 40%.h<sup>-1</sup> tendo em conta o crescimento das larvas. No 2 DAE para aplicar o tratamento com temperatura 15 ± 0,7°C, a renovação de água foi reduzida para 10 %.h<sup>-1</sup> para evitar o choque térmico e no dia seguinte (3 DAE) ajustou-se para 15%.h<sup>-1</sup>.

Em relação ao arejamento utilizou-se um fluxo fraco, mais ou menos 2 a 3 bolhas de ar ao longo da coluna de água no decorrer do ensaio.

O fotoperíodo usado foi de 14h dia e 10h noite, com lâmpadas LED, dispostas por cima dos tanques.

Diariamente efetuou-se a verificação do caudal, assegurando a manutenção da renovação de água, a limpeza dos tanques por aspiração (do fundo e das paredes) e dos filtros da saída de água (para evitar a colmatação e acumulação de matéria orgânica). A contagem de larvas mortas e as medições dos parâmetros, temperatura e oxigénio dissolvido efetuou-se duas ao dia.

#### **4.2.1 Método da “água verde”**

Durante o cultivo larvar recorreu-se ao método de “água verde” que consiste na utilização de microalgas nos cultivos marinho. Este método descrito por Pousão-Ferreira (2009) tem como objetivos:

- a) Manter a qualidade nutritiva das presas, nomeadamente de rotíferos e *Artemia* spp.;
- b) Estabilização da qualidade da água, pela remoção de amónia e outros produtos azotados e produção de O<sub>2</sub>;
- c) Aumento da visibilidade das presas pelas larvas melhorando o contraste e dispersão da luz.

Desde do início do ensaio, logo após a distribuição das larvas nos tanques adicionou-se uma mistura de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* (No) e *Isochrysis galbana* (Tiso), nos tanques com capacidade de 200 L no total eram colocados 2 L (1L No + 1L Tiso) enquanto para os tanques com capacidade de 600 L

era introduzida o triplo da quantidade (3 L No +3 L Tiso) perfazendo um total de 6 L, duas vezes por dia (Fig.7).



Figura 7 – Adição do mix de duas microalgas *Nannochloropsis oculata* (No) e *Isochrysis galbana* (Tiso) nos tanques de cultivo.

#### 4.2.2. Alimentação

A alimentação começou a ser administrada quatro vezes ao dia, após a abertura da boca aos 3 DAE. Inicialmente, como alimento foram fornecidos rotíferos (*Branchionus* spp.) enriquecidos até aos 10 DAE. A partir dos 8 DAE, foi introduzida *Artemia* enriquecida e aos 9 DAE foram adicionadas quantidades mínimas de ração, de forma a familiarizar as larvas ao alimento inerte, Caviar (Bernaqua TM) (Fig. 8). Ambos os alimentos vivos (rotíferos e artémia) foram enriquecidos RedPepper® (Bernaqua TM) antes de ser administrados.

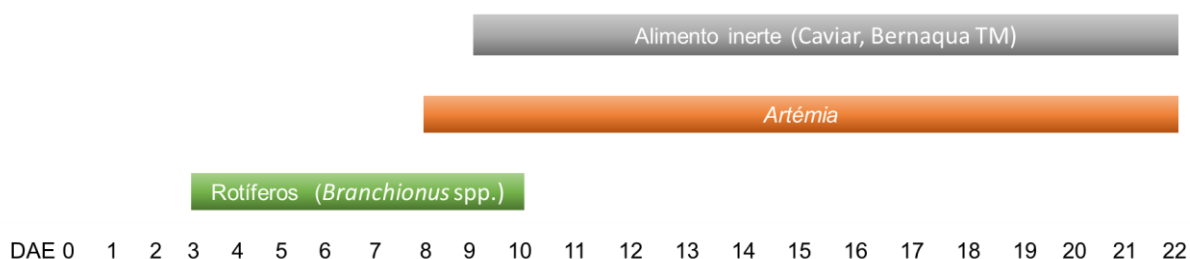


Figura 8 – Esquema do regime alimentar utilizado durante o cultivo larvar de corvina (*Argyrosomus regius*).

### 4.3 Procedimento laboratorial

#### 4.3.1. Amostragem larvar

Com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento larvar nos cultivos com diferentes temperaturas, procedeu-se a amostragens diárias até aos 13 DAE, depois aos 17 DAE e aos 20 DAE, para biometria referente ao comprimento total (Fig. 9) e para peso seco (Fig.10) efetuaram-se amostragens nos dias 2, 5,8, 10, 17 e 20 DAE. De cada tanque, foram recolhidas aleatoriamente 15 larvas para comprimento total e foram utilizadas 5 larvas para peso seco.

Para amostragem do peso seco e histologia, as larvas não podiam ter alimento no trato digestivo. Por esse motivo, a recolha de larvas era realizada no início do dia, antes da primeira alimentação. As larvas eram passadas por um filtro (dependente do seu tamanho) para retirar o alimento e colocadas em *goblets* com água limpa durante 1h a 1h30 para efetuarem a digestão.



Figura 9– Aparelho onde foram realizadas a medição do comprimento total.



Figura 10– Balança de precisão onde foram realizadas as pesagens das larvas.

#### 4.3.2. Histologia

Para estabelecer a ontogenia do sistema imune em peixes, é necessário analisar os órgãos linfáticos, timo, rim anterior e baço através da histologia (Klosterhoff et al., 2015). Assim desde dos 0 DAE até 13 DAE, 15, 17, 20 e 22 DAE foram recolhidas várias larvas de corvina (*A. regius*) (Tabela I). As amostras foram fixadas com formol a 10% durante 24-48h. Ao fim deste tempo foram efetuadas as lavagens das amostras com

PBS (phosphate buffered saline) a 1% (3 vezes durante 15 minutos), água (1 vez durante 15 minutos) e transferidas para álcool a 70%, para posterior análise histológica.

Tabela I – Número de larvas de corvina (*Argyrosomus regius*) recolhidas durante o ensaio experimental para histologia.

DAE	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	15	17	20	22
Nº de larvas/ por tanque	+20	15	15	15	15	15	15	15	15	10	10	15	15	15	10	10	15	15

#### 4.3.2.1. Desidratação e Impregnação em parafina

Mais tarde, as amostras foram transferidas dos tubos para cassetes histológicas devidamente identificadas para serem colocadas no processador de tecidos (Processador Leica TP 1020, Fig. 11). Neste aparelho, procedeu-se à desidratação das amostras através da passagem por vários álcoois (80, 96 e 99%). Desta forma a desidratação decorre gradualmente permitindo manter a integridade dos tecidos. Em seguida, sucessivas imersões em xilol permitem que o álcool presente nos tecidos seja substituído por este solvente. Posteriormente, vai facilitar a impregnação dos tecidos com parafina líquida (procedimento descrito no anexo 1).



Figura 11 – Cesta com as cassetes histológicas (à esquerda); processador de tecidos (Processador Leica TP 1020, à direita).

De seguida procedeu-se a inclusão das amostras em parafina líquida com o objetivo de conferir suporte aos tecidos, utilizando um dispensador de parafina (Leica EG 1140 H, Fig. 12). As larvas foram colocadas e orientadas (de forma a facilitar o corte) num molde coberto com parafina liquefeita e posteriormente coberto com a casete.

Este conjunto foi colocado a arrefecer numa placa de refrigeração resultando num bloco para a microtomia (Fig.13).



Figura 12 – Dispensador de parafina.



Figura 13 - Blocos de parafina para microtomia.

#### 4.3.2.2. Microtomia dos blocos de parafina

No micrótomio foi fixado o bloco com o tecido embebido em parafina. A primeira etapa do corte consiste em remover o excesso de parafina até ser possível aceder ao tecido de interesse. É necessário ter muito cuidado pois o tecido de importância pode ser removido ou a superfície do bloco pode ser danificado (Pichat et al., 2018). Neste trabalho experimental, os cortes foram efetuados no micrótomio Leica RM-2155 (Leica Vienna, Austria) utilizando uma espessura de 4-5  $\mu\text{m}$  (Fig.14).

As seções finas com os tecidos foram retiradas do micrótomio e colocadas num banho maria com água entre 35 a 38°C (Fig.15). E em seguida foram dispostas em lâminas e colocadas a secar numa estufa a 36°C, durante pelo menos 24h até ao processo de coloração.



Figura 14 – Micrótomio utilizado para realizar os cortes com uma espessura de 4-5  $\mu\text{m}$ .

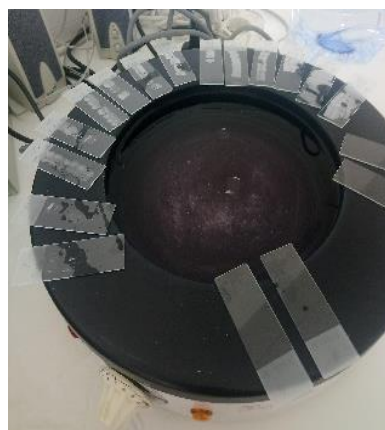


Figura 15 – Banho maria onde foram colocados os cortes obtidos.

#### 4.3.2.3. Coloração dos tecidos

A Hematoxilina e Eosina (H&E) é a coloração mais comum, fácil de realizar em seções de parafina e além disso mostra uma ampla gama de componentes celulares e tecidos normais e anormais (Pichat et al., 2018). A hematoxilina tem uma cor azul-púrpura profunda e cora os ácidos nucleicos, por outro lado a eosina é cor de rosa e cora proteínas de forma não específica. Num tecido típico, os núcleos são corados em azul, enquanto o citoplasma e a matriz extracelular apresentam diferentes graus de coloração rosa (Li e Chen, 2017).

Após a secagem dos cortes, as lâminas foram coradas utilizando o método de coloração H&E (descrito no anexo 2). Primeiro passaram pelo procedimento de desparafinação, onde foi utilizado o xilol como solvente, seguidamente foram hidratadas com um gradiente de álcoois (100, 96, 70 e 50%) e água, depois coradas com hematoxilina. Para remover o excesso de corante foram passadas por água, álcool ácido e água novamente, hidratadas com álcool a 96%, em seguida coradas com eosina. Após serem limpas com água foram desidratadas com num gradiente de álcoois (96 e 100%) e clarificadas com xilol (Fig. 16).

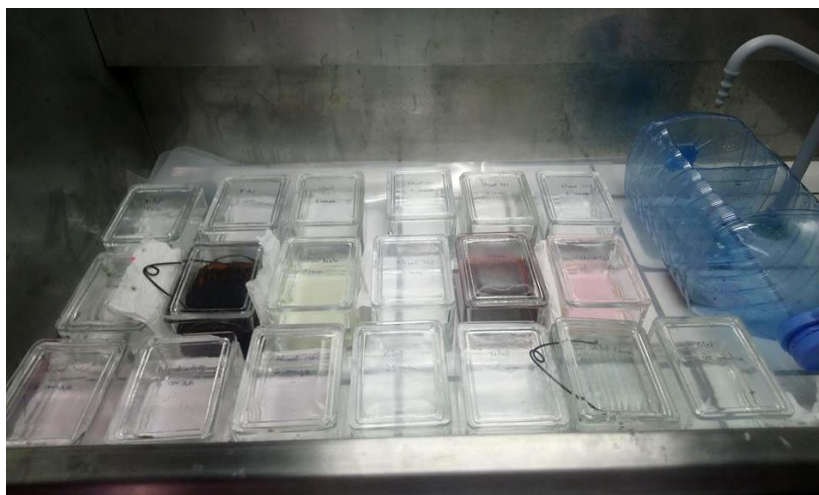


Figura 16 – Procedimento do método de colocação Hematoxilina e Eosina (H&E).

Em seguida, procedeu-se a preparação definitiva dos tecidos por intermédio da montagem das lâminas (Fig.17). Para isso, em cada lâmina foram colocadas gotas de meio de montagem (DPX) e uma lamela por cima dos tecidos, cuidadosamente de maneira a evitar a formação de bolhas de ar. E por fim deixou-se a secar durante 48h a 72h.



Figura 17 – Preparação definitiva dos tecidos: adição do meio de montagem sobre a lâmina (à esquerda) e colocação da lamela por cima dos tecidos (à direita).

#### **4.3.2.4 Observação microscópica das lâminas**

Os tecidos que foram alvo de estudo consistiram nos órgãos linfáticos: rim anterior, timo e baço, em larvas de corvina (*A. regius*). O aparecimento dos órgãos foi validado através da observação da sua presença no mínimo em 6 larvas.

As preparações definitivas foram observadas ao microscópio ótico DS-L3 da NIKON com uma câmara DS acoplada. Os tecidos foram observados e identificados utilizando uma ampliação de 100x e 400x, e posteriormente fotografados.

#### **4.4. Análise estatística**

Com o objetivo de comparar as diferenças do comprimento total e peso seco médios das larvas de corvina entre as diferentes temperaturas realizou-se um teste paramétrico *t-student*. Sempre que adequado os resultados apresentam-se sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância de 5% (i.e., *p-value* < 0,005). Todos os cálculos foram realizados mediante o recurso ao software estatístico IBM SPSS Statistics 21.

Página deixada intencionalmente em branco

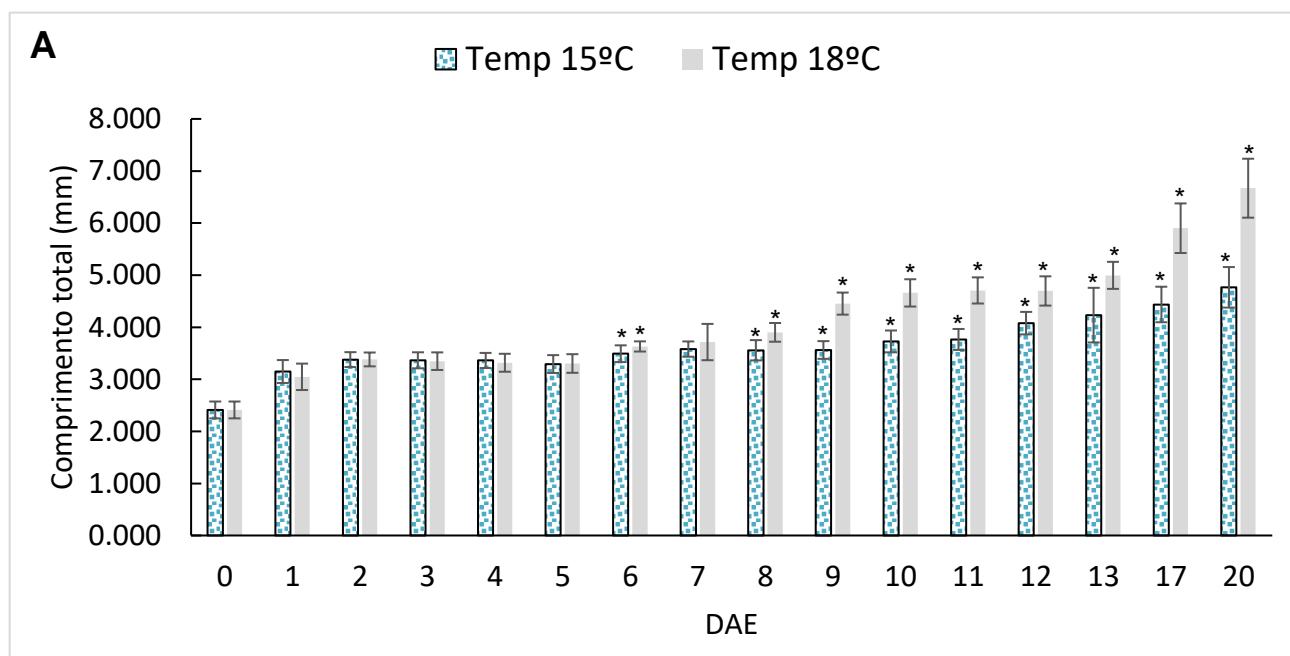
## 5. Resultados

### 5.1 Biometria das larvas de *Argyrosomus regius*

De forma a avaliar o efeito da temperatura durante o cultivo larvar de *A. regius* foram avaliadas medidas de biometria, nomeadamente o comprimento total (mm) e o peso seco (mg).

Nos primeiros dias após a eclosão (DAE) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas no comprimento total quando comparadas as duas temperaturas. No entanto, a partir dos 6 DAE (exceto 7 DAE) até aos 20 DAE existem diferenças estatisticamente significativas no comprimento total quando comparadas as duas temperaturas ( $p$ -value <0,05) (Fig.18 A). Em relação ao peso seco, a partir dos 10 DAE até aos 20 DAE existem diferenças estatisticamente significativas quando comparadas as duas temperaturas ( $p$ -value <0,05) (Fig.18 B).

Verificou-se que as larvas de corvina apresentaram um crescimento maior no tratamento com a temperatura a 18°C em relação ao tratamento com a temperatura a 15°C. Aos 20 DAE, as larvas cultivadas a 18°C possuem um comprimento total e peso seco superior quando comparadas com as que foram cultivadas a 15°C,  $6,67 \pm 0,56$  mm;  $0,56 \pm 0,06$  mg e  $4,77 \pm 0,38$  mm;  $0,12 \pm 0,04$  mg, respetivamente.



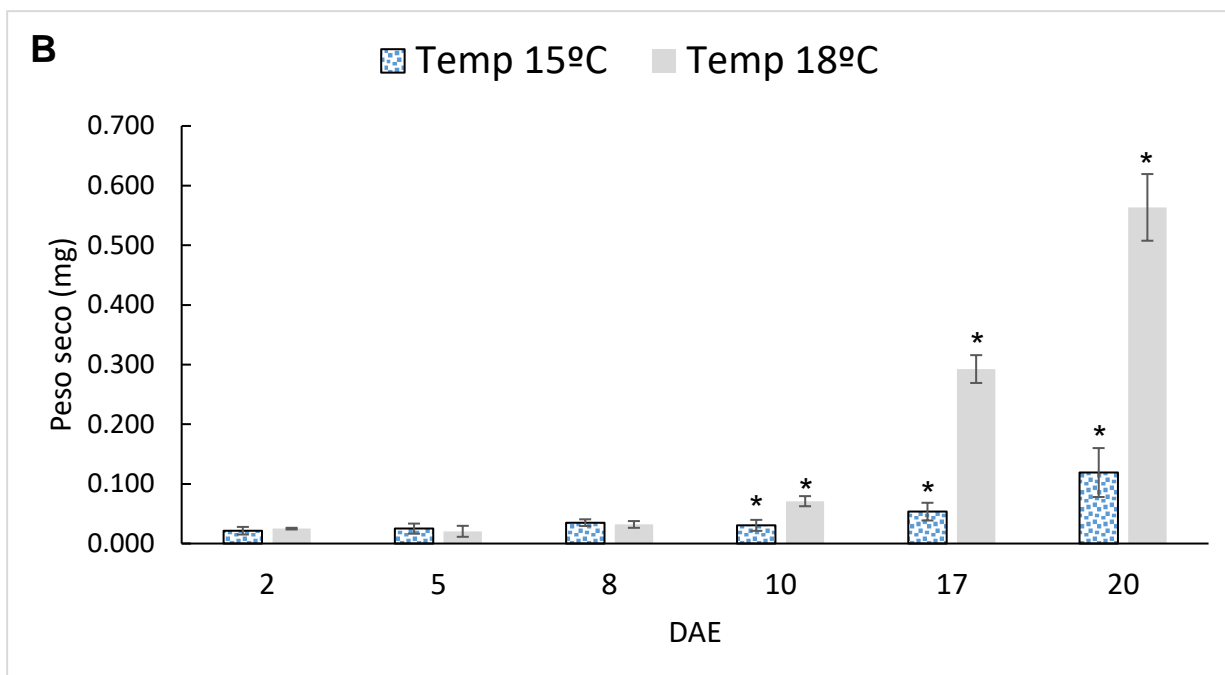


Figura 18 – Crescimento das larvas de *Argyrosomus regius* a diferentes temperaturas. A) Comprimento total (mm) ao longo dos DAE quando comparadas as duas temperaturas. B) Peso seco (mg) ao longo dos DAE quando comparadas as duas temperaturas. Os resultados são apresentados sob a forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP). O símbolo \* representa as diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (*t-student*, *p-value* <0,05).

## 5.2 Ontogenia dos órgãos linfáticos em *Argyrosomus regius*

Durante a ontogenia das larvas de corvina (*A. regius*), o rim anterior foi o primeiro órgão linfático a aparecer aos 0 DAE ( $2,41 \pm 0,2\text{mm}$ ), seguindo-se o baço aos 6 DAE ( $3,63 \pm 0,1\text{mm}$  à temperatura de  $18^\circ\text{C}$  e  $3,51 \pm 0,1\text{mm}$  à temperatura  $15^\circ\text{C}$ ), e mais tarde verificou-se aos 8 DAE ( $3,9 \pm 0,2\text{mm}$  à temperatura de  $18^\circ\text{C}$  e  $3,6 \pm 0,2\text{mm}$  à temperatura  $15^\circ\text{C}$ ) a presença do timo.

Neste estudo, nas larvas de corvina verificou-se que o rim anterior já estava presente no momento da eclosão (0 DAE), através da observação de células hematopoiéticas e células indiferenciadas dispersas abaixo da notocorda e por cima da reserva vitelina (Fig. 19 A). Pela primeira vez aos 2 DAE, nas larvas de corvina foram observados túbulos renais, estruturas que constituem o rim anterior (Fig.19 B). Ao longo do desenvolvimento das larvas de corvina observou-se um aumento do número de túbulos renais e de tecido hematopoiético em ambas as temperaturas (Fig. 19 C, D, E e F), mas mais evidente no tratamento com a temperatura  $18^\circ\text{C}$ .

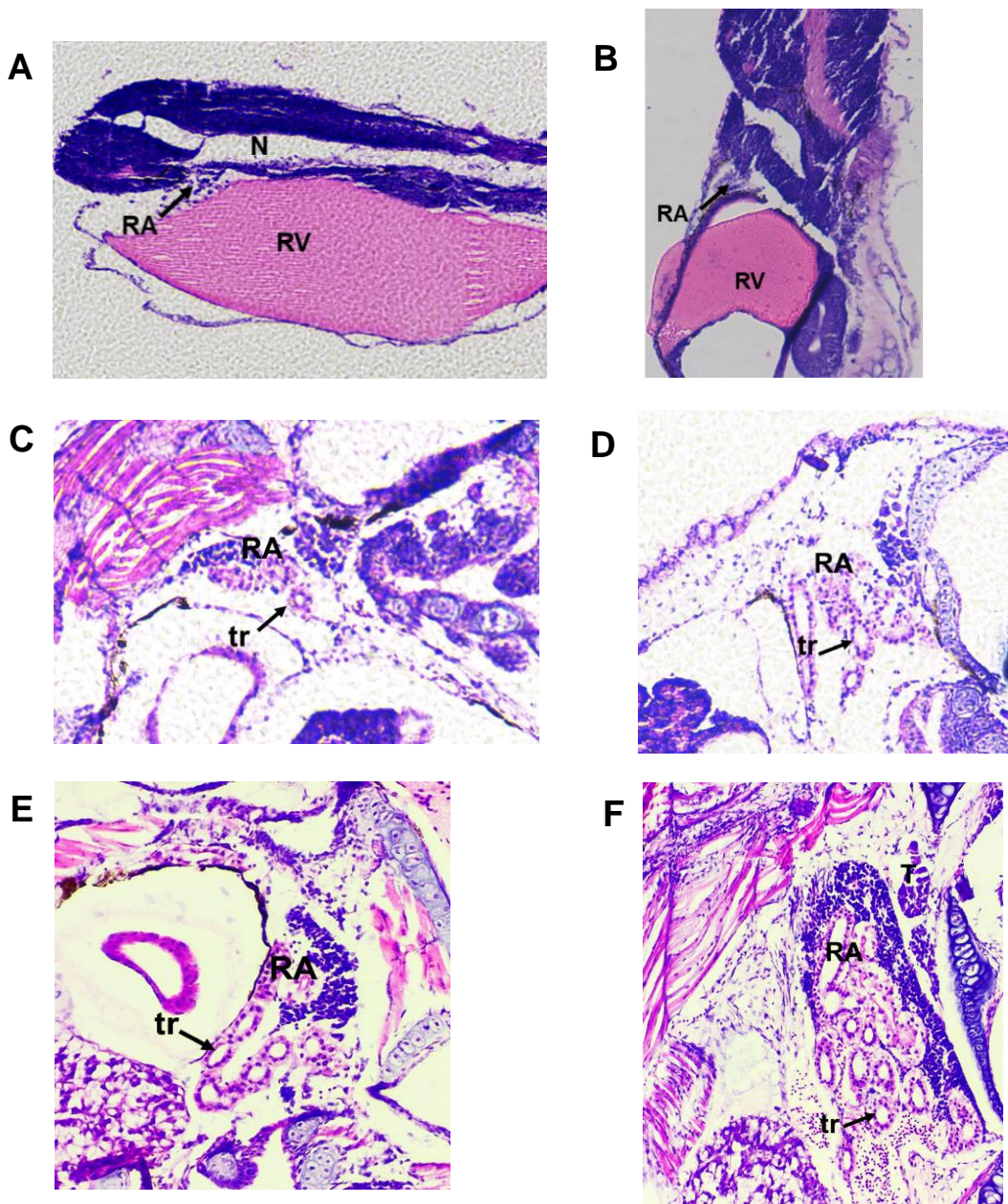


Figura 19 – Morfologia e desenvolvimento do rim anterior em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. A) 0 DAE: aparecimento do rim anterior (RA), células hemapoéticas dispersas, 100x. B) 2 DAE: Rim anterior, aparecimento dos primeiros túbulos renais, 100x. Aos 12 DAE, o aspecto do rim anterior na temperatura de 15° e 18°C, (C) e (D) respectivamente, 400x; Aos 22 DAE, o rim anterior apresenta um menor número de túbulos renais a 15°C (E) em relação ao número de túbulos renais observados a 18°C (F), 400x; Abreviaturas: N – notocorda; RA - rim anterior; RV-reserva vitelina.

A primeira evidência do aparecimento do timo em corvina surgiu aos 8 DAE, independente da temperatura de cultivo das larvas. Localizado acima da cavidade branquial e próximo da cavidade do ouvido interno observou-se a presença de algumas células indiferenciadas, de grandes dimensões e núcleos escuros, provavelmente

linfoblastos (Fig. 20 A e B). Em ambas as temperaturas, aos 12 DAE, o timo das larvas de corvina apresentava a formação de uma cápsula apesar de se observar ainda células indiferenciadas de grandes dimensões (Fig. 20 C e D, 15°C e 18°C, respectivamente). Ao fim dos 22 DAE, o timo das larvas de corvina ainda não estava completamente desenvolvido. Ainda é possível observar algumas células indiferenciadas, no entanto verificam-se células de menores dimensões e com núcleos escuros e além disso já é possível observar o órgão encapsulado (Fig. 20 E e F).

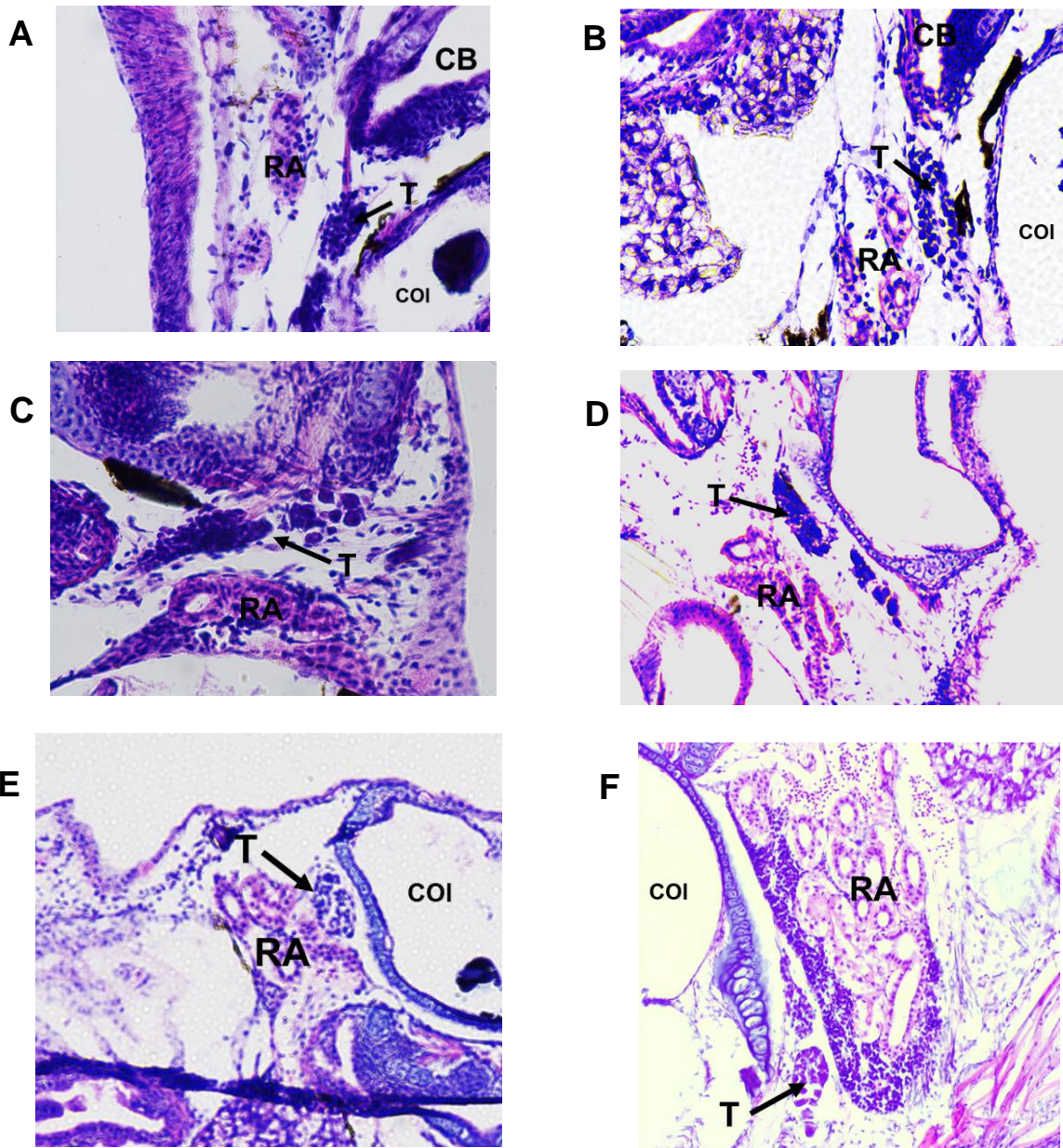


Figura 20 – Morfologia e desenvolvimento do timo em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. Aparecimento do timo ao 8 DAE em ambas as temperaturas, 15° e 18°C, A e B, respectivamente, 400x. O timo localiza-se próximo do rim anterior (RA), da cavidade branquial (CB) e da cavidade do ouvido interno (COI). Ao 13 DAE, o timo apresentava uma morfologia semelhante em ambas as temperaturas, C (15°C) e D (18°C), 400x. Aos 22 DAE, já é possível observar o timo encapsulado em ambas as temperaturas, E e F. Abreviaturas: CB– cavidade branquial; COI – cavidade do ouvido interno; RA – rim anterior; T – timo.

O baço foi observado pela primeira vez aos 6 DAE ligado ao pâncreas, apresentava uma forma circular com algumas células indiferenciadas (Fig. 21 A e B). Com o desenvolvimento das larvas a temperaturas diferentes verifica-se um aumento do tamanho do baço (que se reflete num aumento do número de células) na temperatura mais alta comparado com o tamanho do baço da temperatura mais baixa aos 12 DAE (Fig. 21 C e D) e aos 22 DAE (Fig. 21 E e F). Além disso já é possível observar o baço encapsulado em ambas as temperaturas a partir dos 12 DAE.

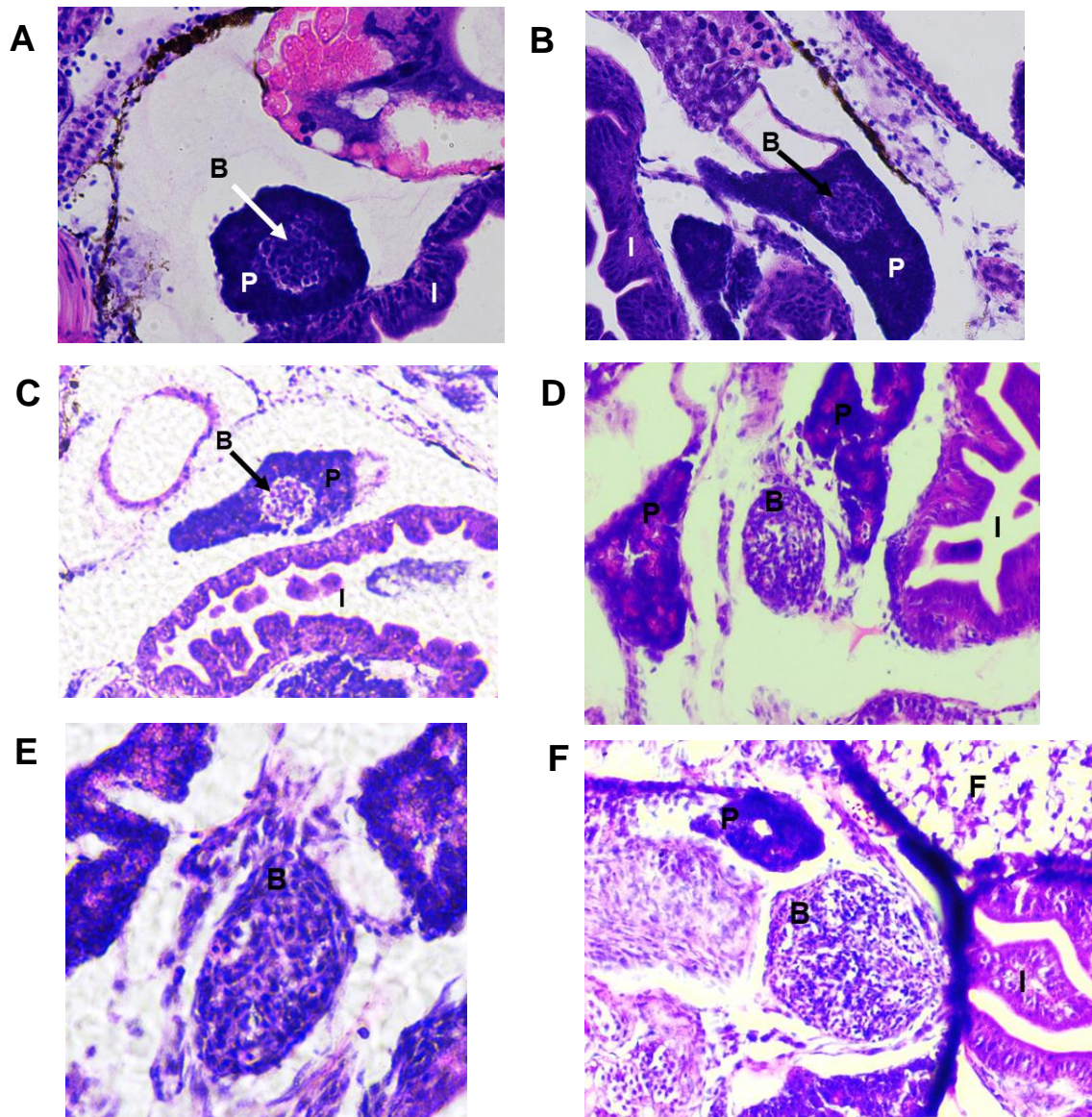


Figura 21 – Morfologia e desenvolvimento do baço em larvas de corvina (*Argyrosomus regius*), H&E. Ao 6 DAE aparecimento do baço A e B 15° e 18°C, respetivamente, 400x; Aos 12 DAE, o baço apresenta uma forma circular em ambas temperaturas, 15°C (C) 100x, 18°C (D) 400x; Aos 22 DAE, o baço é menor na temperatura de 15°C (E) em comparação na temperatura 18°C (F), 400x.; Abreviaturas: B – baço; F- fígado; I – intestino; P- pâncreas.

Página deixada intencionalmente em branco

## 6. Discussão

### 6.1 Crescimento de larvas de *Argyrosomus regius*

A temperatura é um fator ambiental que tem sido estudado extensivamente em relação à reprodução, ao comportamento animal e à resposta imune. Sabe-se que muitos organismos usam a temperatura para modular eventos sazonais, particularmente os poiquilotérmicos, o que significa que a sua temperatura corporal varia de acordo com a temperatura ambiente (Bowden et al., 2007).

Além disso, a temperatura de cultivo é muito importante em aquacultura já que pode afetar o tempo de desmame e a metamorfose, as taxas de crescimento, o sexo, a qualidade e aparência do pescado, pelo que pode influenciar os custos de produção e consequentemente os lucros (Lee et al., 2017).

No presente trabalho verificou-se que o crescimento das larvas de *A.regius* foi influenciado pela temperatura (Fig. 22), pelo que as larvas cultivadas a 18°C apresentaram um comprimento total e peso seco superior quando comparadas com as larvas cultivadas a 15°C, o que era esperado, uma vez que são organismos poiquilotérmicos, logo as taxas de desenvolvimento e crescimento são muito dependentes da temperatura (Bone e Moore, 2008). O crescimento é a resposta mais comum medida em animais ectotérmicos e é frequentemente medido isoladamente como indicativo da resposta à temperatura. Sabe-se que a temperatura influencia uma série de características, e o desenvolvimento inicial, como a fase larval, é especialmente suscetível à mudança de temperatura (Green e Fisher, 2004).

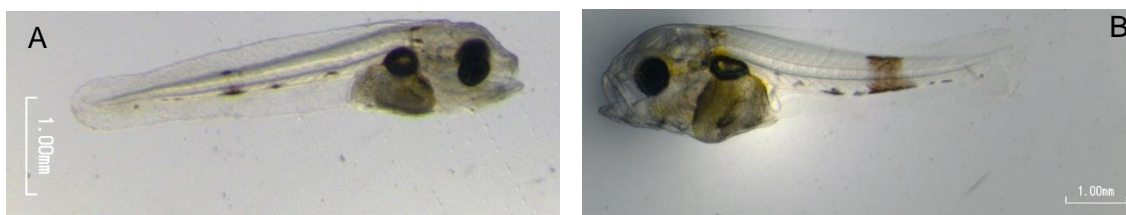


Figura 22 - Larvas de *Argyrosomus regius* aos 22 DAE a duas temperaturas, A (15°C) e B (18°C).

Um estudo realizado por Papadaskis et al. (2013) obteve um comprimento total para larvas de *A. regius*, (5 DAE: 3,66±0,45mm; 11 DAE: 5,38±0,70mm; 14 DAE: 7,38±0,48mm; 20 DAE: 16,00±1,82mm) superior ao obtido neste estudo (Fig. 18 A), uma vez que foi usada uma temperatura de cultivo superior (entre 19-23°C).

Por outro lado, Solovyev et al. (2016) cultivaram larvas de *A. regius* a uma temperatura de 18,2±0,5°C e obtiveram resultados de comprimento total (0 DAE: 3,0±0,1mm; 5 DAE: 3,3±0,1mm; 9 DAE: 3,7±0,2mm; entre 13 DAE e 20 DAE:

4,6±0,4mm) semelhantes aos resultados deste estudo para a temperatura 18,0±0,5°C (0 DAE: 2,41±0,16mm; 5 DAE: 3,3±0,18mm; 9 DAE: 4,45±0,21mm; 13 DAE: 4,99±0,26mm; 20 DAE: 6,67±0,56mm). Comparando os resultados de ambos os estudos, é possível verificar que neste estudo a partir dos 13 DAE o comprimento total foi superior, o que poderá ser explicado pelas diferentes condições de cultivo larvar utilizadas, uma vez que foi usada uma densidade de 26 larvas L<sup>-1</sup> em contrapartida no trabalho desenvolvido por Solovyev et al. (2016) foi usada uma densidade de 200 larvas L<sup>-1</sup>. Segundo Duncan et al. (2013) um fator que afeta muito os resultados de crescimento é a densidade larvar. Roo et al. (2010) avaliaram o efeito da densidade larvar (50 larvas L<sup>-1</sup> e 125 larvas L<sup>-1</sup>) no cultivo de *A. regius* e verificaram que o comprimento total e peso seco foram afetados pela densidade larvar, uma vez que as larvas cultivadas em baixa densidade eram maiores que as cultivadas em alta densidade.

Os resultados obtidos referentes ao peso seco das larvas de *A. regius* mostraram um aumento significativo em ambas as temperaturas a partir dos 10 DAE, o que coincidiu com a introdução do alimento inerte, que foi introduzido pela primeira vez aos 9 DAE. Noutro estudo, também com larvas de *A. regius* observou-se um aumento do peso seco após a introdução da ração aos 20 DAE (Duncan et al., 2013). Segundo Pousão-Ferreira et al. (2013) a introdução precoce de alimentos inertes promove claramente um melhor crescimento nesta espécie.

Para além da temperatura, existem outros fatores como a salinidade, concentração de O<sub>2</sub>, fotoperíodo e pH que possuem impactos significativos no desenvolvimento das larvas de peixe, como sobrevivência, crescimento, alimentação e metamorfose (Le et al., 2011).

Existem diversas condições e protocolos para a produção de larvas de corvina nos diferentes centros de investigação e empresas privadas (Duncan et al., 2013), no entanto utilizam procedimentos semelhantes, incluindo o uso de água do mar filtrada e esterilização por UV (Solovyev et al., 2016; Roo et al., 2010), uma gama de temperatura entre os 18-23°C (Solovyev et al., 2016; Roo et al., 2010; Vallés e Estévez, 2013; Sedki et al., 2017; Papadaskis et al., 2013; Suzer et al., 2013), fotoperíodo 12h-12h dia-noite (Roo et al., 2010; Sedki et al., 2017) e 16h-8h dia-noite (Solovyev et al., 2016; Suzer et al., 2013), a utilização do método da “água verde” (Roo et al., 2010; Vallés e Estévez, 2013; Sedki et al., 2017; Suzer et al., 2013), são alguns exemplos.

Além disto, os protocolos referentes a alimentação das larvas de *A. regius* apresentam diferenças, no entanto a sequência dos alimentos é igual em todos os estudos. O primeiro alimento a ser introduzido são os rotíferos (mais comum *Brachionus*

sp.) desde 3-10 DAE (Suzer et al., 2013), 3-6 DAE (Solovyev et al., 2016), 2-5 DAE (Sedki et al., 2017). A seguir é administrada Ártémia como alimento, a partir dos 12 DAE (Suzer et al., 2013), 14-30 DAE (Valles e Estévez, 2013), 4- 15 DAE (Sedki et al., 2017). E por fim, o alimento inerte introduz-se a partir dos 15 DAE (Suzer et al., 2013), 20 DAE (Vallés e Estévez, 2013). Esta diferença nos protocolos alimentares, justifica só por si, diferenças no crescimento obtidas para ensaios de cultivo larvar à mesma temperatura.

## 6.2 Aparecimento e desenvolvimento dos órgãos linfáticos

Neste trabalho, a sequência de aparecimento dos órgãos linfáticos em larvas de *A. regius* foi rim anterior (0 DAE), baço (6 DAE) e timo (8 DAE). Em teleósteos marinhos, a sequência geral de desenvolvimento de órgãos linfáticos segue a seguinte ordem: rim anterior, baço e timo (Mulero et al., 2007; Uribe et al., 2011; Klosterhoff et al., 2015), embora o baço larval seja mais eritrócito do que linfopoiético (Zapata et al., 2006). Pelo que a sequência de desenvolvimento dos órgãos imunes obtida para as larvas de *A. regius* neste estudo está de acordo com o que está descrito para outros teleósteos marinhos (tabela II).

Tabela II – Aparecimento dos órgãos linfáticos, rim anterior, timo e baço, em diferentes espécies de peixes.

	Espécie	Temperatura	Rim anterior		Timo		Baço		Referência
Peixes marinhos	<i>Argyrosomus regius</i>	• 18,0 ± 0,5 °C • 15,0 ± 0,7 °C	0 dae	2,41 ± 0,16mm	8 dae	• 3,90 ± 0,18mm • 3,56 ± 0,20mm	6 dae	• 3,63 ± 0,10mm • 3,49 ± 0,16mm	Neste estudo
		• 22 ± 1,2 °C	1 dae	-	8 dae	4,49 ± 0,39mm	12 dae	5,69 ± 0,76mm	Campoverde et al. (2018)
	<i>Scophthalmus maximus</i>	• 17,5 ± 2,5 °C	0 dae	-	17 dae	-	11 dae	-	Pados e Crespo (1996)
	<i>Sparus aurata</i>	• 19-20 °C	0 dae	0,18-0,22 cm	29 dae	0,58-0,59 cm	12 dae	0,37-0,41 cm	Josefsson e Tatner (1993)
	<i>Salmo salar</i>	• 4-7 °C	14 dpe	-	22 dpe	-	42 dae	-	Ellis (1977)
	<i>Thunnus orientalis</i>	• 27 °C	1 dae	-	5 dae	-	2 dae	-	Watts et al. (2003)
	<i>Solea senegalensis</i>	• -	3 dae	-	9 dae	-	6 dae	-	Cunha et al. (2003)
	<i>Paralichthys olivaceus</i>	• 20 °C	0 dae	-	21 dae	-	8 dae	-	Liu et al. (2004)
	<i>Polyprion oxygeneios</i>	• 15 a 19 °C	5 dae	-	20 dae	-	16 dae	-	Parker et al. (2012)
	<i>Gadus morhua</i> L.	• 11,5 a 17 °C	5 dae	-	27 dae	9 mm	6 dae	5,5 mm	Schroder et al. (1998)
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i> L.	• 6 °C (até 45 dae) • 12 °C (a partir 45 dae)	0 dae	0,65-2,0mm	33 dae	0,65-2,0mm	59 dae	0,65-2,0mm	Patel et al. (2009)
	<i>Rachycentron canadum</i>	• 29,5 ± 0,3 °C	1 dae	3,8 ± 0,04 mm	7 dae	5,4 ± 0,20 mm	5 dae	4,8 ± 0,2 mm	Klosterhoff et al. (2015)
	<i>Epinephelus bruneus</i>	• 23,4 to 25 8 °C	1 dae	2,90 mm	12 dae	5,01 mm	6 dae	-	Kato et al. (2004)
Peixes de água doce	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	• 14 °C	5 dae	1,8 cm	5 dpe	1,8 cm	3 dae	1,3 cm	Grace and Manning (1980)
<i>Cyprinus carpio</i> L.	• 22 ± 1 °C	1 dae	-	2 dae	0,3cm	5 dae	0,5-0,6 cm	Botham (1981)	

O aparecimento dos órgãos linfáticos para diversas espécies de peixes está contemplado tabela II, onde estão indicados os dias após a eclosão (DAE) e os dias pós-eclosão (DPE) em que os órgãos linfáticos foram observados assim como o comprimento total das larvas no respetivo dia e a temperatura do cultivo larvar. Para

todas as espécies, o rim anterior foi o primeiro órgão linfático a aparecer, seguido pelo baço e por fim o timo, no entanto existem algumas exceções como *Salmo salar*, *Hippoglossus hippoglossus* L. e *Cypricus carpio* onde o timo desenvolveu-se antes do baço (Ellis, 1977; Patel et al., 2009; Botham, 1961).

Um estudo sobre a mesma espécie de corvina (*A. regius*) demonstrou uma sequência de aparecimento dos órgãos linfáticos diferente, primeiro o rim anterior (1 DAE), seguindo-se o timo (8 DAE) e por fim o baço (12 DAE) (Campoverde et al., 2018). Estas diferenças poderão ser explicadas pelas diferentes condições de cultivo utilizadas em ambos trabalhos de investigação. No estudo realizado por Campoverde et al., (2018) a temperatura de cultivo foi superior ( $22 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ ) e o fotoperíodo foi de 16h dia e 8 h noite. Também o protocolo de alimentação aplicado foi diferente (rotíferos 2-14 DAE; artémia 9-31 DAE e ração 21-118 DAE) e a densidade larvar de cultivo não é referida. O comprimento das larvas ao 1 DAE era de  $3,15 \pm 0,1$  mm enquanto que neste estudo foi de  $3,0 \pm 0,2$  mm e de  $3,1 \pm 0,2$  mm, para ambas as temperaturas. Além disso, o plano de amostragens não foi diário (1, 3, 8, 12, 15, 22, 29, 33, 40, 50, 76, 90, 104 e 118 DAE) como no presente estudo, o que poderá explicar os resultados diferentes obtidos, uma vez que neste estudo a temperatura não influenciou o dia de aparecimento dos órgãos.

Geralmente, o desenvolvimento de ovos e larvas de peixes marinhos segue um padrão semelhante, mas aparentemente existem grandes diferenças entre as espécies em relação ao tamanho do ovo, composição do vitelo, taxas de desenvolvimento, tempo de incubação dos ovos, estado de desenvolvimento e tamanho no momento da eclosão (Falk-Petersen, 2005). Desta forma as diferenças na eclosão, bem como o comprimento em diferentes estádios de desenvolvimento durante o período larvar podem explicar a variação observada nos tempos ontogénicos do desenvolvimento dos órgãos linfáticos entre as diferentes espécies (Patel et al., 2009). Além disso, o desenvolvimento de larvas é fortemente afetado pelas condições de cultura, como temperatura, salinidade e fotoperíodo (Falk-Petersen, 2005; Cordero et al., 2016). Aos 0 DAE, as larvas de corvina apresentavam um comprimento total de  $2,41 \pm 0,16$  mm enquanto as larvas de *Rachycentron canadum* ao 1 DAE possuíam um comprimento total de  $3,8 \pm 0,04$  mm (Klosterhoff et al., 2015) tendo sido identificado o rim anterior em ambas as espécies, sendo que as condições de cultivo foram diferentes.

No entanto, as razões anteriormente expostas não explicam o porquê do aparecimento dos vários órgãos diferir entre peixes marinhos e de água doce (Schroder et al., 1998). Uma vez que para as espécies de água doce como *C. carpio* L. a sequência de aparecimento dos órgãos imunes consiste em rim anterior, timo e por fim o baço

(tabela II). Segundo Zapata et al., (2006), em teleósteos de água doce, o timo é o primeiro órgão a tornar-se linfático, embora desde cedo que o rim anterior pode conter células hematopoiéticas, mas não linfócitos.

Existem vários estudos que descrevem a ontogenia e a imunocompetência dos órgãos linfáticos de espécies marinhas como de água doce. Alguns estudos descrevem apenas o desenvolvimento morfológico, enquanto outros descrevem também a expressão de genes relacionados com a imunidade (Schroder et al., 1998; Patel et al., 2009; Cecchini et al., 2013; Ferraresso et al., 2016). No entanto, devido às variações nos métodos utilizados para estudar o desenvolvimento, a comparação direta entre espécies diferentes é difícil. Além disso, a variação na sequência do desenvolvimento de órgãos e o tempo que os órgãos demoram a assumir as suas funções imunes tornam a comparação direta ainda mais difícil. Essas variações também podem ser causadas por vários fatores biológicos, especialmente aqueles que afetam o desenvolvimento durante os estádios iniciais da vida (Patel et al., 2009).

A comparação direta entre os diversos estudos que descrevem o desenvolvimento morfológico durante a ontogenia dos teleósteos é difícil, apesar do método ser o mesmo, através das técnicas de histologia. Quando é feita a observação dos tecidos alguns autores só consideram o aparecimento dos órgãos quando já se encontram parcialmente desenvolvidos, e além disso é necessário ter em conta o número de larvas em que são vistos os órgãos para validar o seu aparecimento. Nem todos os estudos referem o número de larvas onde foram observados os órgãos.

Neste estudo, o aparecimento dos órgãos foi validado quando foram observados em 6 larvas de corvina no início da sua formação, ou seja, a observação foi baseada no tipo de células e na sua localização, nesta fase a maioria dos órgãos ainda não estavam totalmente desenvolvidos. No entanto, os alguns estudos que revelam o número de larvas onde foi observada a presença não é o mesmo para todos, por exemplo Schroder et al. (1998) no seu trabalho utilizaram 2 a 8 larvas por amostra. Por outro lado, Papadakis et al. (2013) e Papadakis et al. (2018) utilizaram apenas 4 larvas por amostra.

O desenvolvimento dos órgãos linfáticos não corresponde necessariamente à maturação da resposta imune adaptativa (Tian et al., 2009). No final deste estudo, os órgãos linfáticos em corvina ainda estavam no início da sua formação e por isso as suas respostas imunes adaptativas estão longe de estar desenvolvidas. Além disso a imunocompetência dos peixes é determinada pelo funcionamento dos linfócitos e não pelo desenvolvimento histológico dos órgãos linfáticos ou pela identificação morfológica das células linfáticas, também é necessário ter em conta que a imunidade mediada por

células se desenvolve um pouco mais cedo do que a resposta humoral (Zapata et al., 2006).

### 6.2.1 Rim anterior

Nos peixes que foram estudados anteriormente, os principais órgãos linfáticos não estão totalmente desenvolvidos no momento da eclosão. No entanto, sabe-se que o rim é um órgão excretor e um órgão linfático primário em peixes, que está presente na eclosão com células-tronco indiferenciadas em muitas espécies de peixes (Falk-Petersen, 2005).

Neste trabalho, o rim anterior já se encontrava presente no momento da eclosão (0 DAE). Noutro estudo para a mesma espécie de corvina, o rim anterior já estava presente no 1 DAE, era constituído por dois prónefros primordiais localizado abaixo do eixo notocordial, com alguns túbulos renais e células hematopoiéticas (Campoverde et al., 201).

Para outras espécies de peixes marinhos, como *Scophthalmus maximus*, *Gadus morhua* L., *S. aurata* e *Hippoglossus hippoglossus* L. o rim também já se encontrava presente no momento de eclosão (tabela II). No caso de *S. maximus*, o rim consiste em elementos excretores e hematopoiéticos, um par de ductos pronéfricos, localizados abaixo do eixo notocordial, que se estendem da região da cabeça até ao ânus. Entre estes ductos pronéfricos apareceram células tronco indiferenciadas grandes e arredondadas com um núcleo proeminente (Padrós e Crespo, 1996). O rim de *H. hippoglossus* L. também consiste em dois túbulos paralelos localizados dorsalmente entre o análogo do intestino e a notocorda, no entanto não foram observados tecidos ou células hematopoiéticas (Patel et al. 2009). Ao 1 DAE, para a espécie *Epinephelus bruneus* o rim estava presente como túbulos situados entre o saco vitelino e a notocorda (Kato et al., 2004).

Segundo Schroder et al. (1998) o número de túbulos renais e a proporção de tecido hematopoiético aumentam com a idade. Na espécie *Paralichthys olivaceus*, a massa de tecido hemapoiético aumentou dramaticamente à medida que o peixe envelheceu, especialmente na parte do rim anterior (Liu et al., 2004). Campoverde et al., (2018) também verificou um aumento do número de túbulos renais em larvas com 3 DAE, e em larvas com 12 DAE, os blastos diminuíram de tamanho e mais escuros com um aumento de células hematopoiéticas.

No entanto, as larvas foram sujeitas a diferentes temperaturas de cultivo o que influenciou o seu crescimento que por sua vez afetou o desenvolvimento dos seus

órgãos. Através da observação da figura 19 é possível ver um menor número de túbulos renais em larvas que foram cultivadas a 15°C (Fig. 19 C) do que em que foram cultivadas a 18°C (Fig. 19 D). E para em ambas as temperaturas, no tecido hematopoiético observaram-se células grandes e arredondadas que representam células indiferenciadas.

À medida que o desenvolvimento progrediu constatou-se um aumento do número de túbulos renais (aos 22 DAE) para ambas as temperaturas. Contudo nas larvas sujeitas a temperatura de 18°C, o rim anterior encontrava-se mais desenvolvido quando comparado com o rim das larvas cultivadas a 15°C. Na figura 19 E observa-se um maior número de túbulos renais e tecido hematopoiético constituído por células de menores dimensões e mais escuras que correspondem a células diferenciadas, possivelmente linfócitos. Por outro lado, na figura 19 E, existe um menor número de túbulos renais e tecido hematopoiético com mais células indiferenciadas.

No caso da espécie *E. bruneus*, aos 7 DAE, as células indiferenciadas aumentaram em número e tornaram-se menores e mais escuras e aos 15 DAE, houve um aumento distinto no tecido hematopoiético e uma variedade de tipos de células foi evidente. Linfócitos pequenos com núcleos profundamente corados foram evidentes aos 30 DAE (Kato et al., 2004).

Em peixes, o rim anterior é considerado análogo à medula óssea de mamíferos e assume funções hemapoiéticas. É o principal órgão imunológico responsável pela fagocitose, processamento de antígenos e formação de IgM e memória imunológica através de MMC's (Carbone e Faggio (2016). Estas estruturas não foram observadas neste estudo, o que indica o sistema adaptativo ainda não está completamente desenvolvido, uma vez que as suas funções incluem locais de deposição de bactérias intracelulares, retenção de ferro, aprisionamento de antígenos, apresentação a células imunes e a recolha de produtos de degradação celular (Evans e Nowak, 2016). No caso de *H. hippoglossus* L. apenas nos estádios de metamorfose e adulto é que foi possível observar os MMC's (Patel et al., 2009). Em relação à espécie *Polyprion oxygeneios*, os MMC's foram observados pela primeira vez aos 45 DAE e o rim anterior já era distinto, e finalmente aos 50 DAE é que a morfologia do rim anterior sugeriu que estava totalmente diferenciado (Parker et al., 2012).

### 6.2.2. Timo

O timo foi observado pela primeira vez aos 8 DAE no presente estudo. Foram observadas células semelhantes no rim anterior pelo é possível que haja uma migração de células para iniciar a formação deste órgão. Na ontogenia, o timo e o rim anterior estão próximos e a migração entre dois órgãos é provável (Watts et al., 2003). Devido à posição próxima do rim anterior e do timo, considerou-se que as células-troncos no timo provêm do rim anterior. Foram identificados blastos hemopoiéticos no rim antes da diferenciação de linfócitos no timo e por isso acredita-se que o timo é povoado inicialmente por células-tronco do rim anterior como referido por Liu et al. (2004).

Tal como neste estudo, Campoverde et al., (2018) também observaram o timo pela primeira vez aos 8 DAE nas larvas de corvina, localizado dorso-posteriormente à cavidade branquial. O timo foi encontrado numa cápsula epitelial e próximo do rim anterior. Verificaram que à medida que a larva se desenvolveu, células de menores dimensões com núcleos profundamente corados foram identificados como linfoblastos ou pequenos linfócitos, sendo que aos 15 DAE, as células blásticas diminuíram e pequenos linfócitos corados foram distinguidos.

A ontogenia e histologia do timo varia de acordo com as espécies (Biller-Takahashi e Urbinati, 2014). Por isso o desenvolvimento inicial do timo foi estudado em várias espécies de peixes teleósteos, e o tempo de desenvolvimento difere entre as espécies de acordo com os efeitos da temperatura no crescimento (Bowden et al., 2005; Uribe et al., 2011).

Em larvas de *D.labrax*, após 27 DAE desenvolveu-se um análogo do timo com evidente aparecimento linfático na porção dorsal de ambas as câmaras branquiais intimamente associadas ao epitélio faríngeo (Abelli et al., 1996). Por outro lado, o primeiro análogo confiável do timo em *H. hippoglossus* L. foi observado aos 33 DAE, com o aparecimento de uma acumulação de grandes células indiferenciadas circulares, mais provavelmente linfoblastos, localizados perto dos arcos branquiais na parte dorsal da cavidade faríngea (Patel et al., 2009). Já para a espécie *P. olivaceus*, o timo aparece aos 21 DAE como uma estrutura dentro do epitélio da parte dorso-posterior da cavidade faríngea, perto dos arcos branquiais, voltada internamente para o rim anterior. Constituído por células indiferenciadas, aparentemente linfoblastos, com formato arredondado. Muitas células indiferenciadas foram vistas migrando da parte do rim anterior para as estruturas tímicas através das fibras de colágeno do septo faríngeo (Padros e Crespos, 1996).

Na maioria das espécies (tabela II), o rim anterior e o baço já estão presentes antes do aparecimento do timo, no entanto desenvolve-se rapidamente e é o primeiro órgão a tornar-se linfático, mesmo antes do rim anterior. As células-tronco hematopoiéticas parecem estar presentes no rim anterior na eclosão, e isso confirma a noção de que o rim anterior é o principal órgão linfático em peixes e que o timo é colonizado por células-tronco originárias do rim anterior (Schroder et al., 1998; Falk-Petersen, 2005).

Para o teleósteo de água doce, como *C. carpio* L., o análogo do timo foi observado acima dos arcos branquiais aos 2 DAE. Aos 4 DAE, o número de células presentes aumentou, tendo sido sugerido serem linfoblastos. Nesta fase o timo não se encontrava encapsulado, mas células semelhantes a fibroblastos nas proximidades do órgão pareciam estar a forma uma cápsula em torno dele. Aos 8 DAE, no timo de larvas de *C. carpio* L. as células predominantes eram linfócitos maduros (Botham e Manning, 1981).

Em *Acipenser oxyrinchus*, o timo foi visível pela primeira aos 48 DAE e nos grupos etários mais velhos, era um órgão bilateral em todos os indivíduos e consistia num córtex externo e numa medula interna, onde se encontravam basófilos redondos identificados como timócitos (Grandi et al., 2014).

Sabe-se que a estrutura do timo é altamente variável entre as espécies (Carbone e Faggio, 2016) e que é o local hematopoiético central para a produção de células T que atuam como principais agentes do sistema imune adaptativo em vertebrados (Ma et al., 2013).

### **6.2.3. Baço**

No presente estudo, nas larvas de corvina, o baço foi observado pela primeira vez aos 6 DAE, por outro lado, a primeira evidência do baço nas larvas de corvinas no estudo de Campoverde et al. (2018) foi aos 12 DAE formado por alguns blastócitos. Conforme o desenvolvimento da larva progrediu, o baço mostrou uma mudança na sua forma inicial de uma bola solta de células blásticas e glóbulos vermelhos, pequenos aglomerados esféricos de células mesenquimais próximas do pâncreas exócrino e da parede do intestino, o que também se verificou neste estudo.

Aos 22 DAE, no baço das larvas de *A. regius* da temperatura quente apesar estar mais desenvolvido, ainda não era possível diferenciar entre a polpa vermelha e a polpa branca (Fig 21 E). Neste estado de desenvolvimento, o baço continuava a apresentar uma forma circular e encontrava-se na cavidade abdominal próximo do pâncreas e do intestino, também já possuía uma cápsula a sua volta.

Noutras espécies o aparecimento do baço dá-se mais cedo, tal como em *R. canadum*, onde foi observado pela primeira vez aos 5 DAE composto por algumas células esplênicas na cavidade peritoneal adjacente à parede do intestino e ao lado do tecido pancreático (Klosterhoff et al., 2015). Em larvas de *P. olivaceus*, aos 8 DAE foi possível identificar o baço. O baço aumentou rapidamente e tornou-se esférico aos 40 DAE (Liu et al., 2004). Em *Oncorhynchus mykiss*, o baço aparece aos 3 DAE e parece ser quase inteiramente eritrócito. E aos 25 DAE, o baço apresentava um caráter linfático. Não foram observadas áreas óbvias de polpa vermelha e branca no baço em nenhum estágio até o final do estudo elaborado por Grace e Manning., 1980.

Noutras espécies o seu aparecimento é posterior tal como em *A. oxyrinchus*, o baço foi visível numa larva com 33 DAE e foi consistentemente observado em peixes mais velhos. Apresentava uma forma triangular alongada e estava localizado na parede abdominal ventro-lateral ao pâncreas e adjacente e lateral à parede intestinal e porção terminal do estômago e pâncreas. E foi caracterizado pela presença de folículos mieloides com principalmente células basofílicas (polpa branca) circundando grandes artérias. Os eritrócitos que formam a polpa vermelha foram encontrados em vasos sanguíneos elipsoidais e espalhados entre os folículos (Gradil et al., 2014).

O primeiro análogo do baço em *H. hippoglossus* L. poderia ser observado aos 59 DAE como um pequeno órgão encapsulado consistindo num pequeno aglomerado de eritrócitos, células reticulares primitivas e sinusoides primitivos. O baço está intimamente associado ao pâncreas e aumenta rapidamente de tamanho, adquirindo uma forma esférica. Mais tarde, aos 66 DAE, o órgão começou a se diferenciar em polpa vermelha e branca (Patel et al., 2009).

O baço contém um sistema de elipsoides esplênicos, MMCs e tecido linfático com função na fagocitose e captura de antígenos (Xu et al., 2018). Até ao final deste estudo não foram observadas estas estruturas características neste órgão, o que indica que o órgão não está completamente desenvolvido, pelo que as suas funções de defesa imunes ainda não estão ativas. O baço funciona como um importante órgão imunológico secundário que produz grandes quantidades de células B IgM<sup>+</sup>. Além disso, é o local principal onde ocorre o processamento de antígenos contra microrganismos patogénicos, por consequente tem um efeito importante no início da resposta imune adaptativa (Qin et al., 2017).

No baço de peixes ósseos, os linfócitos tornam-se detetáveis somente depois de estarem presentes no timo e no rim; uma observação compatível com o papel presumido do timo e do rim como tecidos linfopoiéticos, e do baço como órgão linfático secundário

(Boehm et al., 2012). Como é um órgão secundário é provável que o seu desenvolvimento demore mais tempo em relação ao desenvolvimento dos outros órgãos do sistema imunitário, como o timo e o rim anterior, que são órgãos primários.

Além disso, o baço larvar é um órgão mais eritrócito do que linfopoiético (Zapata et al., 2006) porque uma das funções do baço é o armazenamento e a produção de eritrócitos (eritropoiese) e a destruição de células sanguíneas envelhecidas e afetadas (Li et al., 2017). O fato de assumir funções hematopoiéticas, como produzir eritrócitos e linfócitos, pode explicar o desenvolvimento mais demorado deste órgão linfático, uma vez que o rim anterior e o timo já desempenham funções de defesa.

Página deixada intencionalmente em branco

## 7. Conclusão e Perspetivas Futuras

*Argyrosomus regius* é uma espécie emergente em aquacultura e o seu cultivo tem vindo a aumentar, pelo que é importante estudar e conhecer o seu sistema imunitário para evitar e prevenir surtos de doenças infecciosas. Um maior conhecimento sobre o sistema imunitário permite a aplicação de medidas profiláticas eficazes, para que os peixes adquiram resistência em vez de tolerância as doenças.

Na corvina os órgãos linfáticos apareceram pela sequência descrita para espécies marinhas: rim anterior (0 DAE), baço (6 DAE) e timo (8 DAE). A temperatura não influenciou o aparecimento dos órgãos uma vez que apareceram nos mesmos dias em ambas as temperaturas (15° e 18°C).

Contudo, a temperatura afetou o crescimento das larvas, tendo sido verificado um crescimento significativamente maior nas larvas que foram cultivadas a 18°C em relação as larvas cultivadas a 15°C.

Nas larvas de *A. regius* verificou-se apenas que o dia do aparecimento do baço não coincidiu com um estudo realizado por outros autores na mesma espécie. No entanto não houve diferenças morfológicas dos órgãos e na sua localização.

Além disso, a comparação direta entre as diferentes espécies não é fácil, por diversos motivos, o fato de ser um grupo de organismos diversificados, pelo que exigem condições de cultivo diferentes, a utilização de distintas abordagens e critérios diferentes de observação/ validação dos órgãos.

Desta forma era necessário continuar a acompanhar o desenvolvimento dos órgãos linfáticos nas larvas de corvina complementando com o estudo da diferenciação dos linfócitos, a determinação do aparecimento dos anticorpos, como a IgM assim como estudar os genes envolvidos nas respostas imunes.

Página deixada intencionalmente em branco

## 8. Referências Bibliográficas

- Abelli, L., Picchiatti, S., Romano, N., Mastrolia, L., Scapigliati, G., 1996. Ontogeny of thymocytes in sea bass *Dicentrarchus labrax*: Studies with monoclonal antibodies. Italian Journal of Zoology. 63, 329-331.
- Arechavala-Lopez, P., Uglem, I., Izquierdo-Gomez, D., Fernandez-Jover, D., Sanchez-Jerez, P., 2017. Rapid dispersion of escaped meagre (*Argyrosomus regius*) from a coastal Mediterranean fish farm. Aquaculture Research. 48, 1502-1512.
- Arula, T., Laur, K., Simm, M., Ojaveer, H., 2015. Dual impact of temperature on growth and mortality of marine fish larvae in a shallow estuarine habitat. Estuarine Coastal and Shelf Science. 167, 326-335.
- Awad, E., Awaad, A., 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. Fish & Shellfish Immunology. 67, 40-54.
- Bilal, S., Lie, K.K., Karlsen, O.A., Hordvik, I., 2016. Characterization of IgM in Norwegian cleaner fish (lumpfish and wrasses). Fish & Shellfish Immunology. 59, 9-17.
- Biller-Takahashi, J.D., Urbinati, E.C., 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. Anais Da Academia Brasileira De Ciencias. 86, 1483-1495.
- Bricknell, I., Dalmo, R.A., 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish & Shellfish Immunology. 19, 457-472.
- Boehm, T., Hess, I., Swann, J. B., 2012. Evolution of lymphoid tissues. Review Structure and function of lymphoid tissues. Trends in Immunology. 33,6, 315-321.
- Bone, Q., Moore, R. H., 2008. Biology of Fishes. Third Edition. Taylor & Francis Group. 497.
- Botham, J.W., Manning, M.J., 1981. The histogenesis of the lymphoid organs in the carp *Cyprinus carpio* L. and ontogenetic development of allograft reactivity. Journal of Fish Biology. 19, 403-414.
- Bowden T.J., Cook P., Rombout JHWM (2005): Development and function of the thymus in teleosts. Fish and Shellfish Immunology 19, 413–427.
- Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M.L., Nikoskelainen, S., 2007. Seasonal variation and the immune response: A fish perspective. Fish & Shellfish Immunology. 22, 695-706.
- Campoverde, C., Andree, K. B., Milne, D. J., Estévez, A., Gisbert, E., Carella, F., 2018. Ontogeny of lymphoid organs and mucosal associated lymphoid tissues in meagre (*Argyrosomus regius*). Fish and Shellfish Immunology.
- Carbone, D., Faggio, C., 2016. Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. Fish & Shellfish Immunology. 54, 172-178.
- Castro, R., Jouneau, L., Tacchi, L., Macqueen, D.J., Alzaid, A., Secombes, C.J., Martin, S.A.M., Boudinot, P., 2015. Disparate developmental patterns of immune responses to bacterial and viral infections in fish. Scientific Reports. 5.
- Castro, R., Tafalla, C., 2015. Mucosal Health in Aquaculture. Chapter 2 Overview of fish immunity. Elsevier. 395.
- Cecchini, S., Paciolla, M., Biffali, E., Sorra, M., Ursini, M.V., Lioi, M.B., 2013. Ontogenetic profile of innate immune related genes and their tissue-specific expression in brown trout, *Salmo trutta* (Linnaeus, 1758). Fish & Shellfish Immunology. 35, 988-992.
- Cunha, M.C., Rodrigues, P., Soares, F., Makridis, P., Skjermo, J., Dinis, M.T., 2003. Development of the immune system and use of immunostimulants in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Big Fish Bang, 189-192.
- Cordero, H., Guzman-Villanueva, L.T., Chaves-Pozo, E., Arizcun, M., Ascencio-Valle, F., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2016. Comparative ontogenetic development

- of two marine teleosts, gilthead seabream and European sea bass: New insights into nutrition and immunity. *Developmental and Comparative Immunology*. 65, 1-7.
- dos Santos, N.M.S., Romano, N., de Sousa, M., Ellis, A.E., Rombout, J., 2000. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 10, 583-596.
  - Duncan, N.J., Estevez, A., Fernández-Palacios, H., Vallés, L.R., Allan, Geoff, Burnell, Gavin, 2013. Aquaculture production of meagre (*Argyrosomus regius*): Hatchery techniques, ongrowing and market. In: *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, Chapter: 17. Woodhead Publishing.. 519–541
  - El-Shebly, A. A., El-Kady, M. A. H., Hussin, A. B., Hossuin, M. Y. 2007. Preliminary Observations on the Pond culture of Meagre, *Argyrosomus regius* (Asso 1801) (Sciaenidae) in Egypt. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 2. 5, 345-352.
  - Ellis, A. E., 1977. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leukocyte reactivity. *Developmental immunobiology* (J. B. Solomon & J. D. Horton, eds). Elsevier/North Holland Biomedical Press. 225–231.
  - Evans, D., Nowak, B., 2016. Effect of ranching time on melanomacrophage centres in anterior kidney and spleen of Southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. *Fish & Shellfish Immunology*. 59, 358-364.
  - Falk-Petersen, I.B., 2005. Comparative organ differentiation during early life stages of marine fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 19, 397-412.
  - FAO. 2018. The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome.
  - Ferrareso, S., Bonaldo, A., Parma, L., Buonocore, F., Scapigliati, G., Gatta, P.P., Bargelloni, L., 2016. Ontogenetic onset of immune-relevant genes in the common sole (*Solea solea*). *Fish & Shellfish Immunology*. 57, 278-292.
  - Franchini, A., Ottaviani, E., 2017. Thymus: Conservation in evolution. *General and Comparative Endocrinology*. 246, 46-50.
  - González-quirós, R., Del àrbola, J., García-Pacheco, M. M., Silva-García, A. J., Naranjo, J. M., and Morales-Ninc, B., 2011. Life-history of the meagre *Argyrosomus regius* in the Gulf of Cádiz (SW Iberian Peninsula). *Fisheries Research*. 109,140–149.
  - Grace, M.F., Manning, M.J., 1980. HISTOGENESIS OF THE LYMPHOID ORGANS IN RAINBOW-TROUT, *SALMO-GAIRDNERI* RICH-1836. *Developmental and Comparative Immunology*. 4, 255-264.
  - Gradil, A.M., Wright, G.M., Wadowska, D.W., Fast, M.D., 2014. Ontogeny of the immune system in Acipenserid juveniles. *Developmental and Comparative Immunology*. 44, 303-314.
  - Green, B.S., Fisher, R., 2004. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 299, 115-132.
  - Han, M.M., Ding, F.H., Meng, Z., Lei, J.L., 2014. The effect of vaccinating turbot broodstocks on the maternal immunity transfer to offspring immunity. *Fish & Shellfish Immunology*. 39, 118-124.
  - Houston, R.D., 2017. Future directions in breeding for disease resistance in aquaculture species. *Revista Brasileira De Zootecnia-Brazilian Journal of Animal Science*. 46, 545-551.
  - Josefsson, S., Tatner, M. F., 1993. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*.3, 35-49.
  - Klosterhoff, M.C., Pereira, J., Rodrigues, R.V., Gusmao, E.P., Sampaio, L.A., Tesser, M.B., Romano, L.A., 2015. Ontogenic development of kidney, thymus and spleen and phenotypic expression of CD3 and CD4 receptors on the

- lymphocytes of cobia (*Rachycentron canadum*). *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*. 87, 2111-2121.
- Kato, K., Ishimaru, K., Sawada, Y., Mutsuro, J., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H., 2004. Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fisheries Science*. 70, 1061-1069.
  - Kum, C., Sekkin, S., 2011. The Immune System Drugs in Fish: Immune Function, Immunoassay, Drugs, Recent Advances in Fish Farms, Dr. Faruk Aral.
  - Lazado, C.C., Caipang, C.M.A., 2014. Mucosal immunity and probiotics in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 39, 78-89.
  - Le, Y., Sheng-Yun, Y., Xiao-Ming, Z., Min, L., Jing-Yi, L., Kai-Chang, W., 2011. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecol. Sin.* 31, 241–245.
  - Lee, J.S.F., Cook, M.A., Luckenbach, J.A., Berejikian, B.A., Simchick, C.A., Oden, S.M., Goetz, F.W., 2017. Investigation of long-term effects of larval rearing temperature on growth, deformities, flesh quality, and phenotypic sex of cultured sablefish (*Anoplopoma fimbria*). *Aquaculture*. 479, 91-99.
  - Li, C.W., Chen, T.T., 2017. A novel hematoxylin and eosin stain assay for detection of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya*. *Harmful Algae*. 62, 30-36.
  - Li, G.X., Zhao, Y.L., Wang, J., Liu, B.Z., Sun, X.L., Guo, S., Feng, J.X., 2017. Transcriptome profiling of developing spleen tissue and discovery of immune-related genes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & Shellfish Immunology*. 60, 400-410.
  - Liu, Y., Zhang, S.C., Jiang, G.L., Yang, D., Lian, J.H., Yang, Y.W., 2004. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 621-632.
  - Ma, D.Y., Wei, Y.L., Liu, F., 2013. Regulatory mechanisms of thymus and T cell development. *Developmental and Comparative Immunology*. 39, 91-102.
  - Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 137-151.
  - Mansour, A.T.E., Goda, A.A., Omar, E.A., Khalil, H.S., Esteban, M.A., 2017. Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, *Argyrosomus regius*, juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*. 68, 516-524.
  - Mashoof, S., Criscitiello, M. F., 2016. Fish Immunoglobulins. *Biology*. 5, 45.
  - Millan-Cubillo, A.F., Martos-Sitcha, J.A., Ruiz-Jarabo, I., Cardenas, S., Mancera, J.M., 2016. Low stocking density negatively affects growth, metabolism and stress pathways in juvenile specimens of meagre (*Argyrosomus regius*, Asso 1801). *Aquaculture*. 451, 87-92.
  - Milne, D.J., Campoverde, C., Andree, K.B., Chen, X., Zou, J., Secombes, C.J., 2018. The discovery and comparative expression analysis of three distinct type I interferons in the perciform fish, meagre (*Argyrosomus regius*). *Developmental and Comparative Immunology*. 84, 123-132.
  - Mulero, I., Chaves-Pozo, E., Garcia-Alcazar, A., Meseguer, J., Mulero, V., Ayala, A.G., 2007. Distribution of the professional phagocytic granulocytes of the bony fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during the ontogeny of lymphomyeloid organs and pathogen entry sites. *Developmental and Comparative Immunology*. 31, 1024-1033.
  - Mylonas, C.C., Fatira, E., Karkut, P., Papadaki, M., Sigelaki, I., Duncan, N.J., 2015. Reproduction of hatchery-produced meagre *Argyrosomus regius* in captivity III. Comparison between GnRHa implants and injections on spawning kinetics and egg/larval performance parameters. *Aquaculture*. 448, 44-53.

- D. M. Mokhtar, D. M., 2017. Fish Histology from Cells to Organs, Apple Academic Press, Canada.
- Monfort, M.C. 2010. Present market situation and prospects of meagre (*Argyrosomus regius*), as an emerging species in Mediterranean aquaculture. Studies and Reviews. General Fisheries Commission for the Mediterranean. Rome, FAO. 89, 28.
- Nadarajah, S., Flaaten, O., 2017. Global aquaculture growth and institutional quality. Marine Policy. 84, 142-151.
- Padros, F., Crespo, S., 1996. Ontogeny of lymphoid organs in turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electron microscope study. Aquaculture. 144, 1-16.
- Papadakis, I.E., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2013. Ontogeny of the digestive system of meagre *Argyrosomus regius* reared in a mesocosm, and quantitative changes of lipids in the liver from hatching to juvenile. Aquaculture. 388, 76-88.
- Papadakis, I.E., Kentouri, M., Divanach, P., Mylonas, C.C., 2018. Ontogeny of the eye of meagre (*Argyrosomus regius*) from hatching to juvenile and implications to commercial larval rearing. Aquaculture. 484, 32-43.
- Parker, S., La Flamme, A., Salinas, I., 2012. The ontogeny of New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*) lymphoid organs and IgM. Developmental and Comparative Immunology. 38, 215-223.
- Patel, S., Sorhus, E., Fiksdal, I.U., Espedal, P.G., Bergh, O., Rodseth, O.M., Morton, H.C., Nerland, A.H., 2009. Ontogeny of lymphoid organs and development of IgM-bearing cells in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish & Shellfish Immunology. 26, 385-395.
- Pousão-Ferreira, 2009. Manual de cultivo e bioencapsulação da cadeia alimentar para a larvicultura de peixes marinhos. IPIMAR, Lisboa, Portugal.
- Pousão-Ferreira, P., Castanho, S., Ribeiro, L., Coutinho, J., Bandarra, N. M., Mendes, A. C., 2013. Larval rearing protocols for meagre *Argyrosomus regius*. Larvi '13 – Fish & Shellfish larviculture symposium. Ghent university, Belgium. 6<sup>th</sup>.
- Qin, C., Shao, T., Wang, Y., Gong, q, Yang, Q., Bu, P., 2017. Effect of ammonia-N on histology and expression of immunoglobulin M and component C3 in the spleen and head kidney of *Pelteobagrus vachellii*. Aquaculture Reports 8. 16–20
- Randelli, E., Buonocore, F., Scapigliati, G., 2008. Cell markers and determinants in fish immunology. Fish & Shellfish Immunology. 25, 326-340.
- Rauta, P.R., Nayak, B., Das, S., 2012. Immune system and immune responses in fish and their role in comparative immunity study: A model for higher organisms. Immunology Letters. 148, 23-33.
- Ronneseth, A., Ghebretnsae, D.B., Wergeland, H.I., Haugland, G.T., 2015. Functional characterization of IgM(+) B cells and adaptive immunity in lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.). Developmental and Comparative Immunology. 52, 132-143.
- Roo, J., Hernández-cruz, C. M., Borrero, C., Schuchardt, D., Fernández-palacios, H., 2010. Effect of larval density and feeding sequence on meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) larval rearing. Aquaculture, 302, 82–88.
- Saavedra, M., Pereira, T.G., Carvalho, L.M., Pousao-Ferreira, P., Grade, A., Teixeira, B., Quental-Ferreira, H., Mendes, R., Bandarra, N., Goncalves, A., 2017. Wild and farmed meagre, *Argyrosomus regius*: A nutritional, sensory and histological assessment of quality differences. Journal of Food Composition and Analysis. 63, 8-14.
- Secombes, C. J., Wang, T., 2012. The Innate and Adaptive Immune System of Fish, Woodhead Publishing Limited. 1-66.

- Sedki, S., Kassila, J., Nhhala, H., Chebbaki, K., Akharbach, H., Halla, M.I., Er-Raioui, H., 2017. Is it possible to successfully rear meagre (*Argyrosomus regius* Asso 1801) larvae without using rotifers? *Aquaculture Research*. 48, 5324-5330.
- Shabana, M. M. A., El Rahman, S. H. A., Al Absawy, M. A., Assem, S. S. 2012. Reproductive biology of *Argyrosomus regius* (Asso, 1801) inhabiting the south eastern Mediterranean Sea, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38, 147–156
- Shields, R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. *Aquaculture*. 200, 55-88.
- Schroder, M.B., Villena, A.J., Jorgensen, T.O., 1998. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 22, 507-517.
- Soares, F., Roque, A., Gavaia, P.J., 2018. Review of the principal diseases affecting cultured meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture Research*. 49, 1373-1382.
- Solovyev, M.M., Campoverde, C., Ozturk, S., Moreira, C., Diaz, M., Moyano, F.J., Estevez, A., Gisbert, E., 2016. Morphological and functional description of the development of the digestive system in meagre (*Argyrosomus regius*): An integrative approach. *Aquaculture*. 464, 381-391.
- Subramanian, S., MacKinnon, S.L., Ross, N.W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*. 148, 256-263.
- Suzer, C., Kamaci, H.O., Coban, D., Yildirim, S., Firat, K., Saka, S., 2013. Functional changes in digestive enzyme activities of meagre (*Argyrosomus regius*; Asso, 1801) during early ontogeny. *Fish Physiology and Biochemistry*. 39, 967-977.
- Swain, P., Nayak, S.K., 2009. Role of maternally derived immunity in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 27, 89-99.
- Tafalla, C., Bogwald, J., Dalmo, R.A., 2013. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: Current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*. 35, 1740-1750.
- Tian, J.Y., Xie, H.X., Zhang, Y.A., Xu, Z., Yao, W.J., Nie, P., 2009. Ontogeny of IgM-producing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by in situ hybridisation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 132, 146-152.
- Tort, L., Balasch, J.C., Mackenzie, S., 2003. Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. 22, 3, 277-286.
- Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*. 56, 486-503.
- Vallejos-Vidal, E., Reyes-Lopez, F., Teles, M., MacKenzie, S., 2016. The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology*. 56, 34-69.
- Valles, R., Estevez, A., 2013. Light conditions for larval rearing of meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture*. 376, 15-19.
- Watts, M., Kato, K., Munday, B.L., Burke, C.M., 2003. Ontogeny of immune system organs in northern bluefin tuna (*Thunnus orientalis*, Temminck and Schlegel 1844). *Aquaculture Research*. 34, 13-21.
- Whyte, S.K., 2007. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology*. 23, 1127-1151.
- Xu, C., Li, E.C., Suo, Y.T., Su, Y.J., Lu, M.H., Zhao, Q., Qin, J.G., Chen, L.Q., 2018. Histological and transcriptomic responses of two immune organs, the spleen and head kidney, in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to long-term hypersaline stress. *Fish & Shellfish Immunology*. 76, 48-57.

- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Frias, C.G., Cortes, A., 2006. Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*. 20, 126-13

## Anexos

### Anexo 1 – Procedimento utilizado no processador de tecidos

<b>Programa 3</b>		
1	Álcool a 80%	1h
2	Álcool a 96%	2h
3	Álcool a 96%	2h
4	Álcool a 96%	2h
5	Álcool a 99%	1h
6	Álcool a 99%	1h
7	Álcool a 99%	1h
8	Álcool a 99% + xilol (1:1)	1h
9	Xilol	1h
10	Xilol	1h
11	Xilol + parafina (1/4:1)	3h vácuo
12	Parafina	3h vácuo
Total		19h

### Anexo 2 – Protocolo de coloração Hematoxilina e Eosina utilizado

<b>Coloração Hematoxilina e Eosina (45 min)</b>			
<b>Tina nº</b>	<b>Reagente</b>	<b>Tempo</b>	<b>Observações</b>
1	Xilol	15 min	15 min quando as lâminas não estiveram na estufa
2	Xilol	6 imersões	
3	Álcool a 100%	6 imersões	
4	Álcool a 100%	6 imersões	
5	Álcool a 96%	6 imersões	
6	Álcool a 70%	6 imersões	
7	Álcool a 50%	6 imersões	
8	Água destilada	2 min	
9	Hematoxilina	10 min	Pode ser necessário mais tempo
10	Água da torneira	5 min	
11	Álcool ácido	2 min	
12	Água da torneira	5 min	
13	Álcool a 96%	3 min	
14	Eosina	30 seg	Pode ser necessário mais tempo
15	Água da torneira	30 seg	Enxaguar
16	Álcool a 96%	6 imersões	
17	Álcool a 96%	6 imersões	
18	Álcool a 100%	6 imersões	
19	Álcool a 100%	6 imersões	
20	Xilol	Até clarear	Cerca de 25 min
21	Xilol	2 min	
22	Xilol	2 min	
23	Xilol	Até a montagem	

