CARLOS EDUARDO MALAVASI BRUNO

**Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-
azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii,
Carcharhiniformes**

São Paulo

2016

CARLOS EDUARDO MALAVASI BRUNO

Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3424
FMVZ

Bruno, Carlos Eduardo Malavasi

Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfóides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes / Carlos Eduardo Malavasi Bruno. -- 2016. 77 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Kfoury Junior.

1. Timo. 2. Órgão epigonal. 3. Órgão de Leydig. 4. Baço. 5. Embriogenese. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes", protocolada sob o CEUA nº 9396271113, sob a responsabilidade de **José Roberto Kfoury Júnior e equipe; Carlos Eduardo Malavasi Bruno; Alberto Ferreira de Amorim** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 19/02/2014.

We certify that the proposal "título em inglês", utilizing 30 Fishes (30 females), protocol number CEUA 9396271113, under the responsibility of **José Roberto Kfoury Júnior and team; Carlos Eduardo Malavasi Bruno; Alberto Ferreira de Amorim** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 02/19/2014.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 01/02/1 a 31/12/1

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Peixes**

sexo: **Fêmeas**

idade: **a**

N: **30**

Linhagem: **N/A**

Peso: **a**

Resumo: O tubarão-azul (*Prionace glauca*) é uma espécie cosmopolita, facilmente capturado por embarcações que operam em alto mar, principalmente em navios no oceano Atlântico e Pacífico, sendo fonte de alimentação no Brasil. O período de gestação desta espécie é de 9 a 12 meses, variando o número de embriões por fêmea. Os órgãos linfoides dos elasmobrânquios responsáveis pelo sistema imune do animal são o timo, baço, órgão epigonal e de Leydig, este último ausente no tubarão-azul. Os estudos sobre o desenvolvimento da resposta imune de peixes podem contribuir para a compreensão deste sistema pouco conhecido. Este estudo visa descrever o desenvolvimento embrionário dos órgãos (30 peixes) linfoides, timo, epigonal e baço, do tubarão-azul (*Prionace glauca*), quanto a estrutura e arquitetura macroscópica, microscópica pela microscopia de luz e eletrônica de transmissão.

Local do experimento:

São Paulo, 27 de outubro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Dedicatória

Dedico essa tese a todos os trabalhadores do mar, que vivem uma vida dura e sofrida, mas sempre com alegria a pesar de todo o trabalho e perigo, em especial ao Linaldo Gaudino de Brito “Boris” “in memorian” que faleceu honrosamente trabalhando no mar.

Dedico também a minha esposa Jéssica Leite Cavalcanti Bruno, pessoa fundamental para que essa tese e toda a minha vida acadêmica, agradeço pela ajuda e carinho por todo esse juntos, você tem grande participação em tudo isso, você é parte fundamental para conseguir passar por mais essa etapa da vida.

Agradecimentos

Agradeço a todos os Orixás que sempre estiveram ao meu lado iluminando todo o meu caminho.

Agradeço ao meu orientador Prof. José Roberto Kfoury Junior pela paciência, ajuda nos embarques e por todo o ensinamento.

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Ferreira de Amorim, por ser um verdadeiro pai me acolhendo não só na orientação do trabalho, aulas e cursos, mas também na orientação de vida. Por confiar e acreditar sempre em mim.

Agradeço à Chistina Amorim pelo carinho por ser uma “mami” para mim, por me acolher na “pensão” inúmeras vezes, pelas sopas, e chás e conversas e por cuidar de mim como um filho.

Agradeço a Dra. Rose Eli Grassi Ricci, que mais uma vez foi como uma mãe para mim, principalmente no final dessa tese.

Agradeço ao Sr. José Kowalsky da empresa Kowalsky Comércio e Indústria de Pescados, pelos embarques concedidos a equipe. E também ao Gabriel Calzavara, Victor Calzavara e Victor Cantidio da empresa Atlantico Tuna, pelo embarque concedido e pela ajuda neste trabalho.

Agradeço aos tripulantes do Marbella I, Ramos, Edson, Ninho, Fábio, Ricardo, Arthur, Severo, Massa Bruta, Eriberto e Tenório pela paciência do primeiro embarque e todo o cuidado da tripulação. Agradeço aos tripulantes do Ouled Si Mohand, Marino Lampón, Moreno, Gessino, Comparsa e muitos outros que ajudavam no dia a dia do barco

A Minha mãe biológica Rita e ao meu Pai Geraldo Gonçalves Bruno Junior “in memoriam”, a mãe Silvia, a minha mãe Preta Regina e a minha mãe Japonesa Márcia, que me mostraram que com muita luta e dedicação pode-se conseguir tudo. O Filho de vocês está sendo Negrão!!!!

A minha sobrinha “princesa do tio” Nicolle Rocha Malavasi, amor do tio que me faz rir sempre com suas perguntas sobre a biologia.

Ao Jairo e Irailde, anjos que caíram do céu para me ajudar no momento em que mais precisei, por serem meus ouvintes, por nunca me deixarem desistir e por sempre se empolgarem

comigo. Ao Jeje e Jack por sempre estarem ao meu lado, e me apoiarem, e por me ouvirem sempre, mesmo quando não estão entendendo nada o que estou falando.

Agradeço ao meu melhor amigo, Daniel Janini Delphino, sei que você não tem ideia do que falo muitas vezes, mas sempre me ouviu, voltamos a nos encontrar depois de 20 anos, mas amizades de 35 anos, não sabem o que é o tempo longe, e volta com força total. Ao Bernardo, Renatinho e a tia Fátima, sempre ao meu lado e claro pelos bolinhos de chuva.

Agradeço ao meu grande amigo, e mais que irmão Thierry Salmon, por toda a ajuda no trabalho e as muitas risadas muito obrigado por sempre estar ao meu lado, pelas coletas iniciais e pelo incentivo de sempre.

Agradeço, as minha melhores amigas e irmãs, Cristiane Cagnoni Ramos e Fernanda Cardoso, por toda a ajuda não só no trabalho, mas sempre, pelas muitas risadas sempre, pelas saídas, escaladas e tudo o que fizemos juntos, duas amigas inseparáveis da minha, vida, e desse agradecimento.

Agradeço ao grande amigo André Luiz Veiga Conrado “Bianor”, pela paciência, ensinamentos na histologia, amizade, risadas, e muita conversa, você foi muito importante em várias decisões.

Agradeço a Luana Félix de Melo, pela ajuda nas laminas, no IBIMM e em toda a vida acadêmica.

Agradeço a toda a equipe do IBIMM (Instituto de Biologia Marinha e Meio Ambiente), Edris, Lara, Rubens, Aquira, Amora, Larinha, Darinha, Sarinha e Rodolfa por todo carinho, conhecimento e oportunidades. Ao Junior “Pepinão” e Bruna pelo carinho e inúmeras risadas.

Agradeço ao meu amigo e capitão de barco Eduardo Delfin e a Mirian Delfin, “muchas gracias amigo por enseñarme un poco de la pesca y por toda las charlas, tragos y risas”.

Agradeço a Ione “cabeça” que resurgiu no momento que mais precisei, e demonstrou como ser uma grande amiga “Valeu cabeça, agora vamos acabar logo essa faculdade”.

Agradeço aos meus alunos de IC e TCC, Aline Poscai (Alinete), Aninha, Augusta, Carolina, Julia, Ju Marinho, Iran, Jana, Grazi, Will, Biazinha, Le, Mariana, Pamela e

Thays Caneloi, pelo carinho, paciência e por seguramente me ensinarem muito mais do que consegui ensinar para vocês.

Agradeço aos Funcionários do Setor de Anatomia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, a funcionária Jaqueline, pelas conversas risadas, e conselhos e Aninha da limpeza, pelas conversas, cafés e carinho.

Agradeço a Prof. Dra. Maria Angélica Miglino que me acolheu quando estagiário e por me abrir o caminho nas pesquisas com tubarões.

Agradeço ao técnico de laboratório Ronaldo, por toda a ajuda na histologia e dicas diárias de laboratório, e por toda a paciência em me ensinar a rotina de um laboratório de histologia. Agradeço também ao técnico de laboratório Ednaldo “Índio” pela ajuda e por sempre estar disposto a me ajudar com os tubarões e pelas inúmeras dicas. Duas pessoas muito importantes para todos os pesquisadores do departamento. Vocês com certeza fazem parte deste trabalho.

Agradeço aos funcionários do Instituto de Pesca de Santos, Agar, Thays, Lili e D. Ana, por todo o carinho e por sempre me receberem muito bem.

Agradeço aos meus alunos do Curso Pré Universitário Tetris e todos os professores e coordenadores. Obrigado por fazer meus sábados mais animados #C.F.

As minhas tias e avós e bisavós do Fórum a qual eu admiro demais, muito obrigado por sempre estarem ao meu lado.

E por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus Tios Gerson e Carolina, meus primos, Daniel, Levi e Ligia, por todo o carinho durante a minha existência, Amo Muito Vocês!!!!!!

*“Los pescadores somos los primeros
que respetamos nuestros mares y nos
jugamos la vida a diario para traer un
producto fresco y de alta calidad”.*

(Autor desconhecido)

“Not in this lifetime”

(W. Axl Rose)

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRUNO, Carlos Eduardo Malavasi

Título: Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

RESUMO

BRUNO, C. E. M. **Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes.** [Embryonic development of lymphatic organs blue-shark, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes] 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) é uma espécie cosmopolita, de alto valor comercial, principalmente capturado por embarcações que operam em alto mar e vendido em mercados e feiras-livres. Poucos dados biológicos estão disponíveis sobre esta espécie, principalmente quanto à sua sanidade e, o conhecimento do desenvolvimento de seus órgãos linfoides pode trazer importantes informações neste contexto. Desta forma, o objetivo do trabalho é descrever o desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides em embriões de tubarão-azul: timo, órgão epigonal, baço e órgão de Leydig, quanto à estrutura e arquitetura macroscópica, microscópica e ultraestrutural, pelas técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão. Foram coletados cinco espécimes de cada fase representativa do desenvolvimento embrionário: I, II, III e IV e do animal adulto. O timo foi visível macroscopicamente nas fases III e IV e microscopicamente da fase I a IV. O órgão de Leydig está presente nas fases II, III e IV. O baço e o órgão epigonal estão presentes em todas as fases embrionárias e no adulto. O timo apresentou principalmente populações de timócitos em diversos estágios de maturação e melanomacrófagos, o baço apresentou melanomacrófagos linfócitos em diversos estágios de maturação, neutrófilos, trombócitos e grande quantidade de eritrócitos. O órgão epigonal apresentou um grande número de células imaturas, principalmente de linfócitos e células polimorfonucleares. A função do órgão de Leydig é perdida quando adulta, sendo substituída pelo órgão epigonal. Os resultados desse trabalho permitem sugerir que esses órgãos apresentam uma função hematopoiética desde o início da embriogênese até a fase adulta.

Palavras-chave: Timo. Órgão epigonal. Órgão de Leydig. Baço. Embriogenese.

ABSTRACT

BRUNO, C. E. M. **Embryonic development of lymphatic organs blue-shark, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes.** [Desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do Tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), Elasmobranchii, Carcharhiniformes]. 2016. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The blue shark (*Prionace glauca*) is a cosmopolitan species of high commercial value, easily caught by vessels operating on the high seas and sold in markets and street fairs. Few biological data are available on this species, mainly from their sanity. Studies on development of these lymphoid organs can provide important information in this regard. Thus, the aim of this study is to describe the gross, microscopic and ultrastructural morphology of the embryonic development of lymphoid organs: thymus, epigonal organ, spleen and the Leydig organ by light microscopy and transmission electron techniques. Five specimens were collected from each representative stage of embryonic development: II, III and IV besides adult specimens. Thymus was visible macroscopically at phases III and IV and microscopically from phase I to IV. Leydig organ is presente in phases II, III and IV. Spleen and epigonal organ are present in all embrionic phases and adult. Thymus presented mainly thymocytes populations in several maturation stages and melanomacrophages, spleen presentes melanomacrophages and lymphocytes, neutrophyls, trombocytes and huge amount of erythrocytes. Epigonal organ presented many immature cells, mainly lymphocytes and polimorphonuclear cells. Leidig's organ function is lost in adulthood being replaced by the epigonal organ. The results of this work allow to suggest that these organs present a hematopoietic function since the early development until the adult phase.

Key-words: Thymus. Epigonal organ. Spleen. Leydig organ. Embryogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVO	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	TUBARÃO-AZUL	18
3.2	SISTEMA IMUNOLÓGICO	20
3.3	ONTOGENIA DOS ÓRGÃOS LINFOIDES NOS PEIXES	22
3.4	ÓRGÃOS DO SISTEMA LINFÓIDE	24
3.4.1	Timo	24
3.4.2	Órgão de Leydig	25
3.4.3	Baço	27
3.4.4	Órgão Epigonal	29
3.5	CÉLULAS DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES	29
3.5.1	Linfócitos	29
3.5.1.1	Linfócito T	30
3.5.1.2	Linfócito B	31
3.5.2	Monócitos	31
3.5.3	Macrófagos	32
3.5.4	Eritrócitos	32
3.5.5	Eosinófilos	33
3.5.6	Basófilos	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	35
4.2	COLETA DE MATERIAL	35
4.3	INCLUSÃO E CORTE DE MATERIAL	36
4.3.1	Fixação e Processamento das Amostras para Microscopia de Luz	36
4.3.2	Coloração por Hematoxilina-Eosina	36

4.3.3	Coloração por May Grünwald - Giemsa	37
4.3.4	Coloração Tricrômio de Masson	37
4.3.5	Microscopia eletrônica de transmissão	38
4.3.5.1	Corte semifino	38
4.3.5.2	Corte Ultrafino	38
4.4	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ANÁLISES MACROSCÓPICAS	40
5.1.1	Macroscopia das Fases embrionárias.....	40
5.1.2	Macroscopia dos Orgãos Linfóides.....	42
5.1.2.1	Timo.....	42
5.1.2.2	Orgão de Leydig	44
5.1.2.3	Baço.....	46
5.1.2.4	Órgão Epigonal.....	48
5.3	ANÁLISES MICROSCÓPICAS.....	50
5.1.3	Microscopia dos Orgãos Linfóides.....	50
5.1.3.1	Timo... ..	50
5.1.3.2	Órgão de Leydig	52
5.1.3.3	Baço... ..	53
5.1.3.4	Órgão Epigonal.....	55
6	DISCUSSÃO	58
6.1	DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO.....	58
6.2	MACROSCOPIA ÓRGÃOS LINFOIDES:.....	59
6.3	MICROSCOPIA DOS ÓRGÃOS LINFOIDES:	62
7	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

No Brasil podem ser encontradas 127 espécies de elasmobrânquios (LESSA et al., 1999) destas, 32 são encontradas no litoral do estado de São Paulo (FIGUEIREDO, 1977).

O Tubarão-azul (*Prionace glauca*) é uma espécie cosmopolita, sendo a espécie mais abundante entre os tubarões (NAKANO; SEKI, 2003; LEGAT; VOOREN, 2008; QUAGGIO et al., 2008), habitando as regiões da plataforma continental, em águas superficiais (VASKE-JUNIOR et al., 2009; KOTAS et al, 2010).

Sua captura por embarcações que operam em alto mar é relativamente fácil (NAKANO; SEKI, 2003; QUAGGIO et al., 2008), principalmente em pescaria por grandes barcos espinheleiros nos Oceanos Pacífico e Atlântico, (CAMPANA et al., 2009).

Esta espécie é fonte de alimentação no Brasil e em alguns países da América do Sul e são normalmente vendidos em postas em mercados e feiras livres (CAMPANA et al., 2009).

São espécies de tamanhos relativamente grandes, podendo atingir até 3 metros de comprimento total quando adultos, em ambos os sexos (KOHLE, 2002).

O *Prionace glauca* é vivíparo placentário, ou seja, desenvolve uma placenta que se conecta ao útero da mãe em um determinado estágio embrionário (BONE; MOORE, 2008). O período gestacional é estimado entre 9 a 12 meses (SUDA, 1953; PRATT, 1979) e o número de embriões pode variar de 4 a 135 por fêmea (GUBANOV; GREDOR´YEV, 1975; PRATT, 1979).

Nos peixes o sistema imunológico é complexo, cujos órgãos incluem o timo, baço, o fígado desenvolvido e o rim cefálico, sendo os dois últimos descritos somente para os teleósteos (ZAPATA; CHIBÁ; VARAS, 1996).

Nos elasmobrânquios, os órgãos do sistema imunológico são constituídos pelo timo, baço, órgão de Leydig e epigonal, estes últimos equivalendo-se à medula óssea dos mamíferos, uma vez que estes animais possuem o esqueleto cartilaginoso. Estes órgãos são responsáveis pela função hematopoiética nos elasmobrânquios (FANGE; MATTISSON, 1981).

Os estudos sobre o desenvolvimento do sistema imunológico de peixes são importantes, pois permitem a compreensão dos mecanismos que asseguram o estado de sanidade do animal. A base do sistema imunitário já é evidente apresenta durante a embriogênese em aves e mamíferos, sendo pouco conhecida no desenvolvimento embrionário dos elasmobrânquios, faltando informações detalhadas de macroscopia, histologia e ultraestrutural para essa classe (HAMLETT, 1999).

O desenvolvimento embrionário do tubarão-azul foi descrito por Vargas em 2009, onde o autor separa os embriões e fetos conforme suas características morfológicas e morfométricas, bem como a presença ou ausência de pigmentação ao longo do corpo. O autor descreve um total de seis fases de desenvolvimento embrionário para o *Prionace glauca*, variando entre o menor tamanho 6 cm a embriões acima de 40 cm de comprimento total.

Uma vez que o tubarão-azul constitui uma espécie de extrema importância na economia mundial e pela escassa quantidade de informações biológicas, principalmente relativas à área imunológica, à morfologia e ao desenvolvimento dos órgãos desse sistema, esse trabalho teve por objetivo descrever a macroscopia, microscopia e ultraestrutura do timo, órgão de Leydig, baço e órgão epigonal nas principais fases do desenvolvimento embrionário segundo Vargas (2009) e no adulto dessa espécie, pelas técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, buscando fornecer subsídios iniciais para a melhor compreensão do sistema imunitário e da sanidade do *P. glauca*.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O Objetivo do trabalho é de descrever o desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides: timo, órgão de Leydig, órgão epigonal e baço de embriões do tubarão-azul (*Prionace glauca*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar e acompanhar o desenvolvimento embriológico do timo, baço e órgão epigonal quanto aos seguintes aspectos:

- Estrutura e arquitetura macroscópica
- Estrutura e arquitetura microscópica pela microscopia de luz
- Estrutura microscópica pela microscopia eletrônica de transmissão.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 TUBARÃO-AZUL

O tubarão-azul (*Prionace glauca*) é a espécie de tubarão mais abundante no ambiente marinho, é considerada uma espécie oceânica circunglobal, ou seja, frequenta águas tropicais e subtropicais dos tres oceanos. (NAKANO; SEKI, 2002; BORNATOWISK; SCHWINGEL, 2008; QUAGGIO et al., 2008; LEGAT; VOOREN, 2008). Na costa brasileira é o tubarão mais abundante (HAZIN; LESSA, 2005),

Esta espécie de tubarão é capturada pela frota que opera em alto mar (KAKANO; SEKI, 2002; QUAGGIO et al., 2008), principalmente em pescaria de grandes navios nos Oceanos Pacíficos e Atlântico (CAMPANA et al., 2009). É capturado na pesca de espinhel de atum e espadarte na região sudeste-sul do Brasil (MOURATO, 2007). É fonte de alimentação no Brasil e em alguns países da América do Sul (CAMPANA et al., 2009).

O tubarão azul é uma espécie altamente migratória, possui padrões complexos relacionados com a reprodução e distribuição de suas presas, que podem variar desde a plataforma continental a região pelágica (KOTAS et al., 2010).

Esta espécie pode ser encontrada em profundidades de 150 m a 400 m. (BONATOWISK et al., 2008; KOTAS, 2010), com uma migração nictimeral vertical para cada indivíduo, podendo chegar a se deslocar da superfície até 400 m de profundidade durante o dia e 150 m de profundidade durante a noite (LEGAT; VOOREN, 2008).

Vivem em temperaturas variando de 5° C a 27° C, conforme a latitude e profundidade onde é encontrado (VASKE-JUNIOR; RINCÓN-FILHO, 1998; WALSH; KLEIBER, 2001; NAKANO; SEKI, 2003). Sua relativa abundancia diminui em águas equatoriais, aumentando conforme a latitude (QUAGGLIO et al., 2008).

São comuns a presença de juvenis desta espécie em zonas temperadas altamente produtivas, com abundância de alimento disponível como ocorre em algumas regiões do Atlântico Norte e Sul. Sendo os machos desta espécie, segundo

Kotas et al. (2010), mais abundantes do que as fêmeas na maior parte do ano na região sudeste sul do Brasil.

As fêmeas do tubarão azul migram, desde o sudeste e sul do Brasil, onde ocorre a cópula, seguida da fertilização e gravidez, para o Golfo da Guiné, onde são encontradas fêmeas no começo de gravidez (HAZIN; LESSA, 2005; QUAGGLIO et al., 2008; VALEIRAS; ABAD, 2009).

Todo o período gestacional acontece no sudeste e sul do Brasil (AMORIM, 1992). Porém já houve relatos de fêmeas recém-prenhas também no Golfo da Guiné. Entrando em período de parto em águas temperadas, como na região Sul da África, onde há uma grande disponibilidade de alimento (QUAGGLIO et al., 2008).

A época de acasalamento desta espécie no Atlântico Sul Ocidental ocorre geralmente nos meses de março e maio, e o parto geralmente no período de julho a setembro (KOTAS et al., 2010); porém, segundo Amorim (1992) e Schwingel et al. (2001), ocorrem variações temporais no período de parto evidenciando que a população de *Prionace glauca* não tem um período reprodutivo definido.

A cópula do tubarão azul ocorre no período entre dezembro e fevereiro, em regiões distantes do sudeste brasileiro, porém a fertilização ocorre fora do nordeste brasileiro, no período entre abril e junho, período em que as temperaturas da superfície da água nesta região são mais altas, sendo provável que as fêmeas sejam sexualmente mais propícias em águas mais rasas e quentes, o que facilita a ovulação, fertilização e desenvolvimento primário dos embriões (HAZIN; LESSA, 2005).

A gestação dura em média nove meses, seu nascimento no Pacífico Norte ocorre na época entre dezembro e abril. O tamanho médio dos embriões é de aproximadamente 39 cm de comprimento total (PRATT, 1979). Porém Vargas (2009) descreve o crescimento para a mesma espécie de embriões com tamanhos maiores que 40 cm de comprimento total.

Segundo Domingo et al. (2002), o tubarão-azul foi encontrado na região que abrange desde o Uruguai até o litoral da Bahia, fêmeas com desenvolvimento embrionário prestes a parir no período de janeiro a maio. As maiores taxas de embriões foram ao período da primavera, porém o estudo revelou que mais próximo ao continente Africano, próximo à linha do Equador e próximo à linha do trópico de

Capricórnio na região da África do Sul, foram encontrados indivíduos juvenis menores a 120 m.

3.2 SISTEMA IMUNOLÓGICO

Diferente dos vertebrados superiores, a maioria dos peixes desde sua fase embrionária já são organismos de vida livre, como esses animais vivem em ambientes aquáticos, devem possuir mecanismos de defesa que os proteja contra os patógenos existentes neste ambiente (ROMBOUT et al., 2005).

Os peixes, assim como todos os vertebrados, possuem uma resposta imunológica humoral e celular em órgãos centrais cuja principal função é a defesa do organismo (TORT et al., 2003). A maior parte dos órgãos linfoides encontrados em mamíferos também existe nos peixes com exceção dos nódulos linfáticos e medula óssea (PRESS; EVENSEN, 1999).

Peixes e mamíferos apresentam algumas semelhanças e diferenças em relação a sua função imunológica (NELSON, 1994). No lugar da medula óssea dos mamíferos, esta é substituída nos peixes ósseos pelo rim cefálico que assume a função hematopoiética (MESEGUER et al., 1995; ZAPATA et al., 1996). Ao contrário dos mamíferos, este órgão é o principal responsável pela fagocitose (DANNEVING et al., 1994), processamento de antígeno (KAATTARI; IRWIN, 1985; BRATTGIERD; EVENSEN, 1996) e formação de IgM e memória imunológica através dos centros de melanomacrófagos (HERRAEZ; ZAPATA, 1986; TSUJII; SENO, 1990). Nos peixes cartilaginosos, a medula óssea é substituída pelo órgão de Leydig e órgão epigonal (CARRIER et al., 2004).

Nas lampreias, o tecido hematopoiético é encontrado em uma invaginação da parede do intestino (FINSTAD; GOOD, 1964). Nos elasmobrânquios, essas estruturas associadas ao intestino, são encontradas no órgão de Leydig, este localizado na região do esôfago, e na válvula espiral do intestino. Nestes peixes, a formação de células sanguíneas também ocorre no órgão epigonal (HANSEN; ZAPATA, 1998; BOEHM et al., 2012).

Nos teleósteos, o timo e o baço são considerados os principais órgãos linfoides (ROMBOUT et al., 2005). O timo e o rim cefálico são considerados órgãos linfoides primários, ou seja, responsáveis pela depuração de antígenos solúveis que são lançados na circulação sanguínea (WHYTE, 2007). O baço dos teleósteos também participa da depuração de antígenos oriunda da corrente sanguínea, tendo um papel na apresentação de antígeno e no início da resposta imunitária adaptativa (WORKENHE et al., 2010).

Os tecidos linfoides são áreas reconhecidas pela característica de justaposição de células hematopoiéticas específicas do estroma e componentes distintos (BRENDOLAN et al., 2007; BUETTNER et al., 2010; BAJOGHLI et al., 2011). Os componentes do estroma dos órgãos linfoides não só definem a localização destes tecidos, mas também fornecem sinais necessários para a atração, especificação, maturação e diferenciação de células imunológicas (BOEHM et al., 2010).

Em geral esses tecidos abrigam células tronco hematopoiéticas, que são capazes de dar origem a todas as linhagens de células sanguíneas (BOEHM et al., 2010) e células de defesa imunitárias inespecíficas e específicas (ELLIS, 1977).

As células imunológicas dos peixes apresentam as mesmas características de outros vertebrados (TORT et al., 2003). A morfologia e funcionalidade de células imunológicas dos peixes demonstram uma similaridade a dos mamíferos, tais como os macrófagos, neutrófilos, monócitos, trombócitos, linfócito B, plasmócitos, linfócito T, células natural-killer - NK e eosinófilos (MANNING; NEHLS, 1996; WHYTE, 2007).

Os linfócitos são as células mais produzidas pelos órgãos linfoides, estas se dividem em linfócitos B e linfócitos T (ROWLEY et al., 1988; MILLER, 1998). Outros tipos de células são os mastócitos, célula citotóxica não específica e as células dendríticas (MILLER et al., 1985; EVANS; JASO-FRIEDMANN, 1992; AVILÉS-TRIGUEROS; QUESADA, 1995; REITE, 1998). Os melanomacrófagos são populações distintas presentes nos tecidos hematopoiéticos do baço e rim cefálico nos peixes ósseos e nas áreas periportais do fígado (ROBERTS, 1975; WOLKE, 1992).

Os elasmobrânquios possuem órgãos do sistema imunológico encontrados em todos os vertebrados e outros específicos desta classe (CARRIER et al., 2004). Os principais órgãos linfoides nestes peixes são o timo e o baço, os quais são bem

desenvolvidos e possuem semelhanças estruturais com os vertebrados superiores (ZAPATA, 1980).

Esses dois órgãos são essenciais para a produção de células imunológicas nos vertebrados superiores, tendo sua primeira aparição filogenética nos Chondrichthyes. Como os tubarões não possuem medula óssea e linfa, estes são substituídos por órgãos equivalentes à medula óssea (CARRIER et al., 2004). Nestes órgãos são encontradas estruturas linfomielóides, principalmente granulopoieticas (ZAPATA, 1980).

3.3 ONTOGENIA DOS ÓRGÃOS LINFOIDES NOS PEIXES

Durante o período embrionário, os peixes dependem de seu sistema imunológico inato, este provavelmente se desenvolve em uma idade embrionária mais precoce (ROMBOUT et al., 2005).

Nos teleósteos o desenvolvimento embrionário e a hematopoiese são processos separados e distintos, sendo semelhante aos descritas para os mamíferos (GALLOWAY; ZON, 2003).

Embriologicamente, em *Scyliorhinus canicula* o primeiro tecido do sistema imunológico a se formar é o timo, este órgão deriva da parede dorsal a partir do segundo e quinto pares de bolsas faríngeas (LLOYD-EVANS, 1993; CARRIER et al., 2004). O aglomerado de células que irá tornar o órgão funcional aparece pela primeira vez em torno de três semanas, podendo aparecer até o final do primeiro trimestre de desenvolvimento do embrião. Porém, nesta fase de desenvolvimento embrionário, ainda não são organizados em regiões corticais e medulares. Durante a quarta e quinta semanas os lóbulos já começam a se separar a partir do epitélio da faringe onde continuam crescendo lateralmente para futuramente se ligar e formar uma massa continua de lóbulos. Até o final do segundo semestre, ou seja, oitava semana, o córtex e a medula já são aparentes. Em teleósteos, entre a sexta e sétimas semanas após o nascimento, o timo sofre atrofia completa (LLOYD-EVANS, 1993; CARRIER et al., 2004).

O tamanho e localização do timo estão relacionados ao crescimento somático do animal em fetos e neonatos, o timo pode ser facilmente identificado quando exposto, porém, com o crescimento do animal e o seu amadurecimento, o aumento da massa muscular na região do timo torna difícil à sua localização (ZAPATA, 1980).

Este órgão, em algumas espécies de salmonídeos, pode ser encontrado antes da eclosão do ovo (ELLIS, 1977; RAZQUIN et al., 1990). Contudo, em algumas espécies de peixes marinhos, o timo é encontrado após o nascimento do peixe, sendo o último órgão linfoide a se desenvolver durante a embriogênese (O'NEILL, 1989; CHANTANACHOOKHIN et al., 1991; JOSEFSSON; TATNER, 1993; ABELLI et al., 1996; PADRÓS; CRESPO, 1996; BREUIL et al., 1997; SCHRODER et al., 1998; DOS SANTOS et al., 2000; LIU et al., 2004; MULERO, 2007).

A involução do timo com a idade, como ocorre em vertebrados superiores, não é uma característica consistente entre os peixes, podendo variar entre as espécies. Processos apoptóticos ocorrem durante o desenvolvimento do timo em peixes teleósteos, porém esse fenômeno diminui com a idade do animal (ABELLI et al., 1998). A involução do timo pode variar com as mudanças sazonais e com os ciclos hormonais dos peixes (NAKANISHI, 1986). Em animais jovens, esse órgão pode ser mais difícil de se localizar em decorrência do tamanho do animal (COSTA, 2007).

O baço é formado a partir da região interna das brânquias, desde o quarto mês de gestação, porém, nesta fase, ainda não está organizado em polpa vermelha e branca, onde só serão diferenciados no oitavo mês de gestação em *Scyliorhinus canicula* (LLOYD-EVANS, 1993; CARRIER et al., 2004).

O órgão de Leydig começa a aparecer durante a quinta semana, onde são visíveis como grupos celulares tanto dorsal quanto ventral ao esôfago em desenvolvimento nos elasmobrânquios (CARRIER et al., 2004).

Os tecidos que vão se diferenciar em órgão epigonal são os últimos da área linfomieloide a surgir, mesmo com uma crista genital já visível ao final da terceira semana. Os granulócitos, entretanto não aparecem até a sétima semana, assim como o desenvolvimento das gônadas, que ocorrem da nona a décima segunda semana (CARRIER et al., 2004).

A estrutura dos órgãos linfoides e a presença de linfócitos em seu interior não tem correlação com a sua atividade funcional e o grau de maturação das células,

indicando que a imunocompetência é atingida algum tempo após a formação dos órgãos linfoides, após a formação de diferentes populações de leucócitos (MULERO et al., 2007).

3.4 ÓRGÃOS DO SISTEMA LINFÓIDE

3.4.1 Timo

O timo está localizado na região dorso-medial para ambas as regiões das brânquias. Em alguns peixes teleósteos, esse órgão não se separa completamente a partir da faringe e não sofre o processo de migração ao longo da vida do animal (LE DOUARIN et al., 1984; LAM et al., 2002; GREVELLEC; TUCKER, 2010).

Este órgão é envolvido por um tecido, formando assim uma bolsa tímica (BOWDEN et al., 2005), sendo bem desenvolvido, tanto nos peixes ósseos quanto nos cartilaginosos, porém é ausente nos Agnatas (PASTORET et al., 1998).

Em elasmobrânquios, é organizado em lóbulos distintos, cada lóbulo consiste em um córtex externo e uma medula interna (PRESS; EVENSEN, 1999; RODEWALD, 2008). Possuem variações de células, posição anatômica, estrutura dos lóbulos tímicos e quanto à origem do desenvolvimento (GE; ZHAO, 2013). Nos teleósteos em geral, o timo não é bem definido, não sendo possível diferenciar medula de córtex (ROMANO et al., 1999), porém segundo Rodewald (2008), muitas espécies de teleósteos possuem apenas um timo composto por dois lobos bilaterais.

Nos mamíferos, o timo tem um papel chave no início da vida. O córtex e a medula histologicamente revelam que ambos podem conter timócitos em diferentes estágios de maturação, embora uma pequena porcentagem destes irá completar sua maturação no timo antes de serem liberados para a circulação periférica como linfócitos derivados do timo, conhecidos como linfócitos T (CARRIER et al., 2004).

Nos teleósteos, o córtex é a camada mais externa do timo, onde apresenta normalmente densidade mais elevada de timócitos e relativamente poucas células epiteliais, estas, quando presentes, são caracterizadas por projeções celulares

longas e delgadas (PRESS; EVENSEN, 1999). A região cortical é composta por numerosos linfócitos e linfoblastos, alguns em mitose, numa rede de células reticulares muito ramificados, que são unidas por desmossomas. Algumas das células contêm monofilamentos, células mioídes que, assim como em vertebrados superiores, têm citoplasma repleto de miofilamentos, tubos de T, e inclusões lipídicas. Existe também a presença de manchas medulares menos densas com fibras reticulares e macrófagos. Nos elasmobrânquios há ausência dos corpúsculos tímicos de vertebrados superiores, e cistos epiteliais são escassos (HAMLETT, 1999).

A medula é menos densamente povoada com células, mas as células epiteliais são mais proeminentes formando assim uma malha de apoio. O suprimento vascular para o timo é mais desenvolvido na medula e há indícios de que a barreira hemato-tímica exista e, que os vasos sanguíneos são a única ligação para outros órgãos (PRESS; EVENSEN, 1999). Alguns autores propõem que as células epiteliais produzem fatores importantes para a maturação dos timócitos e a aquisição de características específica de timócitos (CHILMONCZYK, 1992).

Nos elasmobrânquios, o timo também é fonte de vários peptídeos, incluindo o hormônio de timulina, envolvidos na comunicação entre os sistemas imunológico e neuroendócrino (HAMLETT, 1999).

Os estágios iniciais da diferenciação dos linfócitos T ocorrem na região cortical do timo, enquanto que as fases subsequentes da diferenciação ocorrem na região medular (PETRIE; ZUNIGA-PFLUKER, 2007). Embora as células T progenitoras serem originadas de tecidos hematopoiéticos, estas migram para o ambiente tímico especializado para uma maior diferenciação (ANDERSON et al., 2007).

3.4.2 Órgão de Leydig

Nos anfíbios, aves e mamíferos, a medula óssea é o local onde ocorre a hematopoiese, nos peixes ósseos, esta ocorre no rim cefálico. Nos elasmobrânquios, essa função ocorre no órgão de Leydig e no órgão epigonal. O

primeiro aparece como uma grande massa branca rosa na parede do esôfago, estendendo-se dorsalmente desde a região ventral da boca até a região cárdica. Neste órgão são encontradas células eosinófilas, granulócitos, heterófilos e linfócitos (HAMLETT, 1999).

Segundo Mattson e Fänge (1982), o órgão de Leydig, é constituído de duas massas esbranquiçadas nas regiões dorsal e ventral do esôfago (MATTSON; FÄNGE, 1982). Tubarões das espécies *Prionace glauca* e *Ginglymostoma cirratum* têm um órgão de Leydig ausente ou muito pequeno (HAMLETT, 1999).

Seu tecido é constituído de grandes números de leucócitos maduros e imaturos e tecido conjuntivo. Os lóbulos são formados por pequenos amontoados de células e separado por espaços onde se encontram veias irregulares. Histologicamente, o tecido se assemelha a medula óssea dos vertebrados terrestres, embora não produzam células vermelhas e não possuem gordura em seu tecido (MATTSON; FÄNGE, 1982).

A maioria das células do órgão de Leydig é semelhante às células sanguíneas dos vertebrados e mesmo de alguns invertebrados (BESSIS, 1973).

Os leucócitos encontrados no órgão de Leydig são muitas vezes encontrados em grupos difusos ou folículos, ocorrendo principalmente com células eosinófilas granulocíticas e pequenos linfócitos que, quando submetidos à coloração de Giemsa, pode-se verificar que o tecido se apresenta em mosaicos de granulócitos manchados e de células não granuladas em azul (MATTSON; FÄNGE, 1982).

Segundo Mattson e Fänge (1982), para uma melhor identificação dos tipos de leucócitos, é necessário à microscopia eletrônica de transmissão, onde é possível identificar detalhes estruturais das células para uma identificação mais segura.

Quando submetido à técnica de microscopia eletrônica de transmissão, o órgão de Leydig apresentou grânulos em formas esféricas, porém, em contraste com o que geralmente são encontrados, os grânulos contêm um núcleo cristalino. A periferia é disposta de grânulos. Estas células são circundadas por grânulos e normalmente possuem um retículo endoplasmático rugoso circundado por grânulos. As células eosinófilas, fazem parte de apenas 5% do total de células granulocíticas (MATTSON; FÄNGE, 1982).

No citoplasma das células do órgão de Leydig são encontradas estruturas semelhantes às encontradas em plasmócitos dos mamíferos, as características de

cisternas e retículos endoplasmáticos, com a presença de ribossomos, indicam que a principal função das células é a síntese de proteínas. Estudos demonstram uma eficiente produção de imunoglobulinas que estimula a resposta antigênica nos elasmobrânquios que ocorre no órgão de Leydig (LITMAN et al., 1976; MARCHARLONIS, 1977), o que demonstra que este órgão possui uma função fundamental no sistema imunológico destes animais (MATTSON; FÄNGE, 1982)

3.4.3 Baço

Evolutivamente o baço é o órgão linfoide secundário mais antigo, embora o papel de remoção de células sanguíneas envelhecidas ou danificadas provavelmente anteceda as funções imunológicas deste órgão (BRENDOLAN et al., 2007). Nos peixes em geral é o órgão hematopoiético mais importante (FANGE, 1985), sendo o principal responsável pela síntese de anticorpos. Assim como nos mamíferos, os plasmócitos, linfócitos B diferenciados, são responsáveis pela produção de anticorpos. Macrófagos são comuns dentro dos elipsoides e estão localizados dentro da polpa branca (HAMLETT, 1999).

Nos elasmobrânquios, o baço é facilmente localizado devido à sua coloração vermelha escura arroxeada. Nos tubarões o baço é alongado e posicionado ao longo da margem exterior da região do estômago (ZAPATA, 1980). O sangue é drenado para o interior da veia porta-hepática, a partir da artéria celíaco-mesentérica. Este material é constituído de uma massa de polpa branca, localizada principalmente em torno dos grandes vasos sanguíneos, com polpa vermelha entre os dois. A polpa é constituída de tecido eritróide, e contém alguns granulócitos e plasmócitos e numerosos linfócitos, monócitos e macrófagos (HAMLETT, 1999).

Histologicamente, o baço é composto das regiões de células vermelhas e brancas, apresentando uma organização estrutural semelhante à de outros vertebrados (ZAPATA, 1980). As regiões dispersas da polpa branca são acúmulos densos de pequenos linfócitos com artérias centrais assimetricamente colocados (CARRIER et al., 2004). As áreas de polpa branca são circunscritas por áreas menos densas de polpa vermelha compostas de seios venosos preenchidas

primeiramente por eritrócitos e, em uma menor quantidade, por linfócitos (ANDREW; HICKMAN, 1974).

A polpa branca é constituída por massas de linfócitos (HAMLETT, 1999), onde os mesmos se multiplicam (ANDREW; HICKMAN, 1974). Nesta mesma região ocorre o alinhamento dos macrófagos aos interstícios da polpa vermelha, removendo os eritrócitos avariados ou envelhecidos (PRESS; EVENSEN, 1999).

Em *Scyliorhinus canícula* e *Ginglymostoma cirratum* jovens, as células linfoides da polpa branca consistem principalmente de linfócitos B. Em animais adultos, nestas áreas também são encontradas uma zona central de linfócitos T, e células dendríticas (LLOYD-EVANS, 1993; RUMFELT et al., 2002). Na truta-arco-iris e zebrafish, os linfócitos se tornam detectáveis somente depois de presentes no timo e no rim cefálico como tecido hematopoiético e no baço como órgão linfoide secundário (ZAPATA et al., 2006).

Embora a presença de células maduras, imaturas e em divisão, impressões esplênicas confirmam que este tecido seja um local para a produção de linfócitos, e granulócitos (CARRIER et al., 2004).

Numerosos eritrócitos são armazenados na polpa vermelha, que são liberados pela contração do baço, na ocorrência de uma súbita necessidade de aumento da capacidade de transporte de oxigênio do sangue, durante o exercício vigoroso ou hemorragia (HAMLETT, 1999).

Os melanomacrófagos do baço são as principais células de destruição dos eritrócitos (AGIUS; AGBEDE, 1984; ZAPATA; COOPER, 1990). A capacidade dos melanomacrófagos de reter antígenos por longos períodos, possivelmente seja devido à sua formação imuno-complexa, semelhante aos vertebrados superiores (ELLIS; DE SOUSA, 1974; FERGUSON, 1976; AGIUS, 1980).

Em espécies de peixes teleósteos que não pertencem à classe dos salmonídeos, as agregações de melanomacrófagos formam um centro destas células, que podem ser ligados a uma fina capsula rodeada de polpa branca e associada com paredes finas e vasos sanguíneos estreitos (AGIUS, 1980; HERRAEZ; ZAPATA, 1986; ELLIS et al., 1989).

3.4.4 Órgão Epigonal

O órgão epigonal é encontrado apenas nos elasmobrânquios, e se encontra contínuo caudalmente a partir da margem posterior das gônadas em todas as espécies de tubarões e raias (SMITH et al., 2004). Está intimamente associado ao mesentério em que ocorre o desenvolvimento gonadal (LLOYD-EVANS, 1993). Sua forma e tamanho variam dependendo principalmente das espécies (CARRIER et al., 2004).

Histologicamente, o órgão epigonal é composto de estruturas que lembram os da medula óssea dos mamíferos, exceto pela ausência de células adiposas. É constituído por um estroma de fibrócitos e fibras colágenas dispostas entre os vasos sanguíneos (BIRCAN-YILDIRIM et al., 2011).

O parênquima do órgão epigonal é constituído por grande quantidade de leucócitos em diversos estágios de desenvolvimento, localizados no estroma, este formado por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. São também encontradas quantidades significativas de granulócitos (FÄNGE; MATTISON, 1981; ZAPATA, 1980; CARRIER et al., 2004; SMITH et al., 2004).

Bircan-Yildirim et al. (2011), em estudos com *Rhinobatos rhinobatos*, descreve que a atividade mitótica dos eritrócitos é frequentemente detectada no órgão epigonal, demonstrando que a replicação, bem como a maturação destas células ocorrem regularmente neste órgão.

3.5 CÉLULAS DOS ÓRGÃOS LINFÓIDES

3.5.1 Linfócitos

Em *Ginglymostoma cirratum*, os linfócitos são células arredondadas e de tamanho variado, seu núcleo é arredondado e grande, cobrindo a maior parte do citoplasma e não possuem grânulos visíveis (PINZÓN; ALDANA, 1996). Nos

mamíferos, apresentam projeções citoplasmáticas, facilitando a diferenciação (MATOS; MATOS, 1995).

Na microscopia eletrônica de transmissão são observadas poucas organelas e numerosos ribossomos e algumas mitocôndrias quando visto em células grandes (SMITH et al., 2004).

Estas células possuem papel importante na imunidade adaptativa dos elasmobrânquios, existindo dois tipos de linfócitos, B e T (RUMFELT et al., 2002).

3.5.1.1 Linfócito T

Os linfócitos T são células localizadas no córtex tímico, onde chegam pelas artérias, migrando em direção à medula, onde adentram a corrente sanguínea (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010). Desempenham um papel chave em determinadas respostas imunitárias do organismo (LIEM et al., 2001). Participam na resposta mediada por células, em que as células atacam diretamente as células infectadas por vírus, fungos e outras células estranhas. Porém outras células T auxiliam na ativação de linfócitos B. (LIEM et al., 2001).

A maturação do linfócito T nos mamíferos, ocorre em etapas envolvendo a recombinação somática e a expressão do TCR, proliferação celular, expressão dos co-receptores CD4 e CD8 e a seleção positiva e negativa induzida por apresentação de antígenos próprios pelas células presentes no estroma tímico (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010).

Estas células reconhecem os antígenos intracelulares, destruindo os patógenos ou a célula infectada. Possuem antígenos na membrana e reconhecem apenas os peptídeos antigênicos ligados a proteínas do hospedeiro, que são codificados pelos genes do sistema principal de histocompatibilidade, se expressando nas superfícies de outras células (MAISEY et al., 2010).

3.5.1.2 Linfócito B

Nos mamíferos, os linfócitos B são produzidos inicialmente no saco vitelínico e posteriormente, durante a vida fetal, é produzido no fígado e medula óssea. As células que vão se diferenciar em linfócitos B permanecem na medula óssea até que se maturem. Já os Linfócitos B maduros, deixam a medula e adentram a corrente sanguínea, posteriormente migrando para os órgãos linfoides secundários (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010). Nos teleósteos essas células são produzidas no rim cranial (SCAPIGLIATI et al., 1999).

Estas células são responsáveis pela imunidade humoral que produz e libera anticorpos capazes de neutralizar ou destruir antígenos. Com a ativação do linfócito B ocorre o processo de proliferação e diferenciação desse tipo de célula (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010).

O desenvolvimento e maturação das células B em peixes assim como as demais células sanguíneas, ocorrem no rim cefálico, porém em algumas espécies também podem ocorrer no baço (SCAPIGLIATI et al., 1999).

3.5.2 Monócitos

Os monócitos do *Gimnglymostoma cirratum* são células grandes de forma esférica, normalmente arredondada. Possui o núcleo pequeno, redondo ou alargado em forma de rim e descentralizado, com cromatina densa e ausência de nucléolo (PINZÓN; ALDANA, 1996). O citoplasma é basofílico podendo apresentar prolongamentos citoplasmáticos e presença de vacúolos, com ausência de grânulos (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; THRALL et al., 2007).

Estas células atuam na reação inflamatória e na resposta imunológica, são responsáveis pela fagocitose, sendo importante na defesa contra organismos estranhos. Além de possuírem função de fagocitar antígenos, os monócitos possuem habilidades citotóxicas não específicas (CARRIER et al., 2004; THRALL et al., 2007).

Nos demais vertebrados, o termo monócito é designado a células imaturas e o termo macrófago designa-se a células encontradas em tecidos maduros. Nos peixes em geral, essa designação não é feita (CARRIER et al., 2004). Segundo Hyder et al. (1983) e Carrier et al. (2004), em estudos com tubarão lixa, descreve que a diferenciação dos monócitos imaturos para a diferenciação plena para macrófagos ocorre na circulação no sangue periférico. Hyder et al. (1983) não é um apud pq o artigo está disponível na internet. Apud geralmente usamos para obra de difícil acesso.

3.5.3 Macrófagos

São células grandes de formato irregular, o núcleo é excêntrico com margem irregular e em alguns casos apresentam nucléolos. No citoplasma é possível encontrar lisossomos de variados tamanhos (ELLIS, 1976; FERGUSON, 1976).

Os macrófagos são as principais células fagocíticas, desempenham papéis importantes na reposta imunológica específica e não específica (BUENTELLO; GATLIN, 1999). Estas células participam da defesa contra agentes invasores, funcionando como células acessórias para a resposta linfocitária (CARRIER; MUSICK; HEITHAUS, 2004).

3.5.4 Eritrócitos

Nos elasmobrânquios, a morfologia dos eritrócitos se assemelha a de outros vertebrados, exceto aos dos mamíferos. Suas células maduras são ovais, com citoplasma homogêneo, que pode apresentar uma variável quantidade de pontos claros rarefeitos, e presença de vacúolos associados à degeneração das organelas (THRALL, 2007), possui o núcleo condensado de forma ovalado no centro da célula (PINZÓN; ALDANA, 1996; SMITH et al., 2004).

No desenvolvimento dos eritrócitos, as células em fase inicial são tipicamente arredondadas contendo um grande núcleo redondo com pouca cromatina condensada (ZAPATA, 1980; HYDER et al., 1983).

Nos elasmobrânquios, os eritrócitos possuem função de troca gasosa e do equilíbrio ácido-base assim como nos mamíferos (CLAIBORNE et al., 2002).

3.5.5 Eosinófilos

Os eosinófilos possuem tamanhos diversos e apresentam grânulos citoplasmáticos com quantidades e tamanhos variáveis. Possui o núcleo arredondado e excêntrico, em alguns casos bilobulados, com cromatina compacta (RODRÍGUEZ, 1991) e apresentam grânulos dispostos por todo o citoplasma. Esta célula é abundante no tecido hematopoiético, mucosa intestinal, mesentério e brânquias (TAVARES-DIAS et al., 2005).

Os eosinófilos dos elasmobrânquios são diferenciados dos heterófilos por sua forma, tamanhos e pela morfologia dos grânulos, núcleo condensado podendo ser redondo ou multilobulado (SMITH et al., 2004).

Na observação pela microscopia eletrônica de transmissão, observa-se que o citoplasma dos eosinófilos contem heterocromatina arredondada e elipsoidal, grânulos muitas vezes com um componente fibrilar central, grânulos moderadamente densos e ausência de inclusões cristalinas (SMITH et al., 2004).

3.5.6 Basófilos

Os basófilos são células de formato arredondado e contorno irregular. O núcleo é centralizado e normalmente lobulado, variando de arredondado a oval, apresentando cromatina compacta e ausência de nucléolos (WALSH; LUER, 2004). O citoplasma é redondo e com grânulos basofílicos, que recobrem o núcleo e possuem dimensões menores que os neutrófilos (PINZÓN; ALDANA, 1996; RANZANI-PAIVA; SILVA-SOUZA, 2004).

Nos peixes, os basófilos são morfologicamente diferentes entre as espécies, bem como na mesma espécie conforme seu estágio de maturação (SATAKE et al., 2009, TAVARES-DIAS et al., 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da FMVZ-USP nº 9396271113. Autorizado pelo Ministério do Meio Ambiente – MMA, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade – ICMBio. Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO nº 47691-1.

4.1 ANIMAIS E AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram coletados cinco espécimes nas fases I (5 a 10 cm); II (15 e 20 cm) e III (25 a 35 cm), IV (40 a 45 cm) e adulto (2 a 3 m), de fêmeas capturadas no mês de Março, Julho e dezembro de 2014, no sul do Brasil, pela frota espinheleira de Itajaí, oriundos da pesca comercial e doadas pela empresa Kowalsky Pescados LTDA. Também foram coletados em Julho de 2015, no nordeste do Brasil, pela frota espinheleira de Natal, oriundos da pesca comercial, doadas pela empresa Atlantic Tuna LTDA.

4.2 COLETA DE MATERIAL

Os embriões foram retirados do útero e eutanasiados por dessensibilização do encéfalo com o auxílio de uma tesoura. Em seguida foram fotodocumentados "*in situ*". Os animais foram dissecados com o auxílio de uma pinça e bisturi. No convés do barco fez-se uma incisão na região dorsal do condocrânio, expôs-se o tecido tímico, que foi fotodocumentado e coletado. Na região ventral dos animais, fez-se uma incisão longitudinal ventral, expondo-se os órgãos internos, que também foram fotodocumentados antes de serem coletados.

As amostras de timo, baço, órgão epigonal e órgão de Leydig, foram coletadas em tubo falcon de 50 ml, fixadas em formaldeído 4%, pH 7.2. Após 72h a solução foi substituída por álcool 70% e mantida até seu processamento no laboratório de Histologia do Departamento de Anatomia (FMVZ/USP). Para a análise morfológica das células foi utilizada a coloração de May-Grünwald-Giemsa-Wright (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004), Tricrômio de Masson e hematoxilina eosina.

4.3 INCLUSÃO E CORTE DE MATERIAL

4.3.1 Fixação e Processamento das Amostras para Microscopia de Luz

Os órgãos epigonal, timo e baço coletado foram fixados recortados em cubos com lados medindo aproximadamente 0,5cm e colocados em solução fixadora de formalina tamponada a 10%, permanecendo por 24-48 horas para completa fixação. Em seguida o material foi desidratado em série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizado em xilol, com posterior inclusão em paraplast (BANCROFT; STEVENS, 1996). O processamento dos blocos de parafina incluiu corte em micrótomo (Leica® RM 2065) com espessura de 3 µm e adesão dos fragmentos obtidos em lâminas de vidro (Starfrost, Kinnitel Glaser) e mantidos em estufa a 60°C por 24 horas depois as laminas foram submetidas a passagem em baterias de xilol e álcool para as respectivas colorações. A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fischer scientific).

4.3.2 Coloração por Hematoxilina-Eosina

A técnica de coloração com Hematoxilina- Eosina é uma técnica utilizada para a coloração de tecidos em histologia, esta técnica permite diferenciar áreas basófilas pela hematoxilina dando um tom azul-púrpura no núcleo celular e acidófila ou

eosinofílicas pela eosina conferindo afinidade pelas proteínas do citoplasma da célula, corando-o de róseo a vermelho.

O tecido emblocado em parafina foi cortado em micrótomo (3 µm), colocado em banho-maria (30°C) e aderidos em lâminas de vidro. Em seguida, a lâmina foi colocada numa estufa a 60°C overnight e submetida ao protocolo de desparafinização em xilol, hidratação em álcoois e água e foram coradas por HE. As leituras das laminas foram realizadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E-800. As amostras foram utilizadas para determinação do exame histológico.

4.3.3 Coloração por May Grünwald - Giemsa

A coloração de May Grünwald - Giemsa é indicado para coloração de células de sangue periférico, medula óssea ou para estudo citológico de elementos celulares.

As laminas foram mergulhadas no corante May Grünwald- Giemsa por três minutos. Decorrido este tempo, as laminas foram lavadas com destilada para tirar o excesso, depois que secaram foram submetidas à montagem e leitura no microscópio de luz Nikon Eclipse E-800.

4.3.4 Coloração Tricrômio de Masson

Esta coloração é empregada em diferentes aplicações a fim de distinguir células do tecido conjuntivo, colágeno, músculo dentre outros elementos histológicos.

Após desparafinização em xilol por 5 minutos, as laminas foram hidratadas em álcool 99%, 95%, 70% e lavadas em água destilada, em seguida foram submetidas a imersão com hematoxilina férrica de Weigert e lavadas com água destilada novamente, depois, colocadas em solução alcoólica de ácido pícrico por 6 minutos e lavadas em água destilada, depois as laminas foram colocadas em

solução de fucsina Ponceau por 4 minutos, lavadas em água destilada e colocadas na solução ácida fosfomolibdica por 5 minutos e depois mergulhadas na solução de azul de anilina de Masson por 5 minutos, então foram lavadas em água destilada pela última vez, desidratadas e submetidas a montagem das mesmas.

4.3.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 3%, pós-fixadas em tetróxido de Ósmio a 1%, desidratado em séries crescentes de álcoois em concentrações de 50%, 70%, 90% e 100%, lavadas em óxido de propileno, mantidas em óxido de propileno/ resina Spurr, colocadas em resina "*Spurr*" pura e na sequência em moldes para consolidar a polimerização da resina. Do bloco foram obtidos cortes semifinos sob lâminas e ultrafinos sob telas. As telas foram contrastadas com uranilae citrato de chumbo e analisadas e fotodocumentadas ao microscopio eletrônico de transmissão–MORGANI 365 (Phillips FMVZ/USP).

4.3.5.1 Corte semifino

Os cortes semifinos foram feitos com um ultramicrotomo (Leica Reichert Supernova) com 0,5-1 μm de espessura e colocados sobre lâminas histológicas para a realização da coloração com azul de toluidina a 0,5% em bórax a 2,5% (pH 11) por 2 minutos.

4.3.5.2 Corte Ultrafino

Após a confecção dos cortes semifinos, seguiu-se com os cortes ultrafinos medindo 60 nm de espessura. Estes cortes foram colocados em grades de cobre de

200 mesh e cobertas com membranas de formvar seguido de contraste com solução de citrato de chumbo. A análise dos cortes ultrafinos foi avaliada em um microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268 D, FEI Co.; Netherlands) com sistema de captura de imagens integrado (MegaView).

4.4 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise microscópica, as leituras das lâminas serão realizadas em microscópio de luz Nikon Eclipse E-800.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISES MACROSCÓPICAS

Foram coletados cinco embriões de cada um dos diferentes estágios gestacionais e cinco exemplares adultos dos quais foram analisados os aspectos morfológicos. As amostras foram divididas em fase I (5 a 10 cm); fase II (15 e 25 cm); fase III (25 a 35 cm); fase IV (40 a 45 cm) e Adulto (2 a 4 m).

5.1.1 Macroscopia das Fases embrionárias.

Os embriões de tubarão-azul em fase I (5 a 10 cm) de desenvolvimento embrionário são considerados de estágio gestacional inicial, com ausência de pigmentação em todo o corpo do animal, sendo que na região da cabeça e lateral do corpo foi possível visualizar uma coloração mais avermelhada. A região rostral é achatada. (Figura 1 A).

Na fase II (15 a 20 cm), o corpo do embrião apresenta um formato fusiforme. A pigmentação de toda a superfície corpórea começa a ficar mais escura, principalmente na região do rosto, cabeça, nas pontas das nadadeiras dorsais e no lóbulo superior da nadadeira caudal. Os olhos nesta fase ainda estão visivelmente mal formados. O rosto apresenta o formato proeminente (Figura 1 B).

Na fase III (25 a 35 cm), o embrião já apresenta pigmentação azul, cobrindo todo dorso do animal, as nadadeiras peitorais e caudais, sendo que o ventre é ausente de pigmentação (Figura 1C).

Na fase IV (40 a 45 cm), os fetos já possuem características de adultos com uma pigmentação azul escura na região dorsal do corpo e ausência de pigmentação no sentido latero-ventral, porém, a dentição ainda não se encontra visivelmente evidente (Figura 1 D).

Os tubarões em fase adulta (2 a 4 m), apresentam uma coloração azul intensa em toda a região dorsal e ausência de pigmentação no sentido latero-ventral, corpo fusiforme e delgado (Figura 1 E).

Figura 1 – Embriões de tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Marbella I e Ouled Si Mohand

Legenda: **A:** Embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) Fase I (5 a 10 cm). **B:** Embrião Fase II (15 a 20 cm). **C:** Embrião Fase III (25 a 35). **D:** Embrião Fase IV (40 a 45). **E:** Tubarão-azul adulto (2 a 4m).

5.1.2 Macroscopia dos Órgãos Linfóides

5.1.2.1 Timo

O timo no tubarão-azul (*Prionace glauca*) em embriões das fases I e II não é visível macroscopicamente. Observa-se na dissecação somente a musculatura e os arcos branquiais (Figura 2 A e B).

Nos embriões da fase III, o timo se encontra localizado na região dorsal do animal, dorsal ao condocrânio, caudalmente aos olhos, iniciando-se alguns centímetros antes do primeiro arco branquial e se estendendo até a região do quinto arco. Quando exposto, observou-se que os lóbulos não eram organizados, mas que estavam protegidos por uma fina membrana translúcida de tecido conjuntivo que envolve todos os lóbulos em desenvolvimento (Figura 2 C).

Nos exemplares da fase IV, o timo está localizado na região dorsal do animal, dorsal ao condocrânio. Quando exposto, notou-se que se encontra superficialmente, sendo bastante evidente e de fácil identificação macroscópica. É um órgão par, localizado caudalmente aos olhos, que se inicia alguns centímetros antes do primeiro arco branquial, e se estendendo até a região do quinto arco (Figura 2 D). Esse órgão apresenta um formato alongado e está protegido por uma fina membrana translúcida de tecido conjuntivo que envolve toda a massa tímica, sendo inteiramente lobado e apresentando coloração branca com algumas regiões em vermelho (Figura 2 E).

O timo no tubarão-azul (*Prionace glauca*) adulto, não é encontrado neste estágio de vida do animal, sendo visível apenas um tecido muscular e os arcos branquiais. Nesta região foi possível observar uma camada fina de pele, com uma camada de tecido adiposo subjacente e uma densa camada muscular, não sendo possível, portanto localizar o timo ou qualquer outro resquício deste órgão (Figura 2 F).

Figura 2 – Timo de tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto.

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP.

Legenda: **A e B:** Embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) Fase I e II, demonstrando a região onde está morfológicamente localizado o timo, ausente neste estágio de desenvolvimento embrionário. **C:** Embrião Fase III, demonstrando o timo e seus lóbulos em desenvolvimento, Olho e fendas branquiais. **D:** Embrião Fase IV, demonstrando a localização do timo, olhos e brânquias. **E:** Imagem aproximada do timo de tubarão-azul Fase IV, demonstrando sua coloração branca e lóbulos. **F:** Tubarão-azul adulto, demonstrando tecido adiposo, pele e musculatura.

5.1.2.2 Órgão de Leydig

O órgão de Leydig no embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) em fase I, não é perceptível, apresentando a mesma coloração de todo o trato digestório (Figura 3 A). Embriões na fase II apresentam uma formação avermelhada entre a região do esôfago, e o início do estômago (Figura 3 B). Porém animais na fase III apresentam uma massa branca entre a região do esôfago e região posterior do estômago, já revelando a presença de um tecido diferenciado (Figura 3 C). Nos espécimes da fase IV, nota-se uma discreta faixa de coloração levemente mais escura, evidenciando a presença do órgão de Leydig (Figura 3 D). Finalmente no adulto, já não se observa vestígios da proeminência observada nas outras fases (Figura 3 E).

Figura 3 – Baço de tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP.

Legenda: **A:** Embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) Fase I, órgão de Leydig ausente neste estágio. **B:** Fase II, demonstrando a região (Circulo vermelho). onde está localizado o órgão de Leydig, ausencia de pigmentação, mas com uma evidente diferença entre o esôfago e início do estômago. **C:** Fase II, demonstrando a região localizado o órgão de Leydig, Início de pigmentação na região posterior do esôfado. **D:** Fase III, localização do órgão de Leydig (circulo vermelho), demonstrando uma discreta faixa levemente avermelhada na região do esôfago. **E:** Adulto, demonstrando a região onde se localizaria o órgão de Leydig

5.1.2.3 Baço

O baço no embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) está localizado na região peritoneal, é alongado e posicionado ao longo do estômago, percorrendo toda a região cárdica e pilórica. Nas fases I e II, não possui pigmentação, mas já é possível notar a formação dos lóbulos (Figura 4 A e B). Na fase III, o baço já começa a apresentar uma pigmentação mais arroxeada em toda sua extensão e também é possível notar a presença dos lóbulos (Figura 4 C). Na fase IV, quando fresco, o baço apresenta uma coloração arroxeada clara. É um órgão inteiramente lobado, apresentando pequenos lóbulos por toda sua extensão (Figura 4 D). No animal adulto, o baço é muito evidente quando feita uma incisão medial-ventral no animal. Tem coloração arroxeada quando recém coletado e presença de lóbulos por todo o órgão (Figura 4 E).

Figura 4 – Baço de tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP e Marbella I

Legenda: **A:** Embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) fase I, demonstrando a presença do baço margeando o estômago e presença evidente do fígado (seta vermelha). **B:** Fase II, demonstrando o baço e estômago (seta vermelha). **C:** Fase III, demonstrando o baço e estômago (seta vermelha). **D:** Fase IV, demonstrando o baço e estômago (seta vermelha). **E:** Adulto, demonstrando a localização anatômica do baço (seta vermelha).

5.1.2.4 Órgão Epigonal

O órgão epigonal no embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) em fase I está localizado no interior da cavidade celomática, cranialmente ao rim e lateralmente às gônadas masculinas ou femininas. Neste estágio o órgão apresenta uma membrana muito fina e transparente, sendo muito difícil evidenciar macroscopicamente sua localização (Figura 5 A).

Nos animais da fase II, o órgão epigonal apresenta uma membrana fina já começando a ser de fácil identificação, possui o formato de fita longa e estreita, com ausência de coloração por toda sua extensão (Figura 5 B).

Em animais da fase III, o órgão epigonal se apresenta no formato de uma fita longa e mais espessa, sendo ausente de coloração por toda sua extensão. Por ser uma fêmea na imagem, observa-se o órgão epigonal intimamente ligado ao útero (Figura 5 C).

Nos fetos da fase IV, este órgão apresenta coloração esbranquiçada, mesmo em animais recém eutanasiados. Estende-se a partir do fígado até a glândula retal, apresentando dimensões semelhantes em toda a sua extensão (Figura 5 D).

No adulto, o órgão epigonal está localizado próximo ao celoma do animal (seta vermelha); é um órgão largo, estendendo-se crânio-caudalmente praticamente por toda a extensão da cavidade celomática. Apresenta coloração esbranquiçada e um formato de uma fita larga e espessa (Figura 5 E).

Figura 5 – Órgão Epigonal de tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP e Marbella I

Legenda: **A:** Embrião de tubarão-azul (*Prionace glauca*) em fase I, demonstrando a presença do órgão epigonal, fina membrana transparente proxima aos rins. **B:** Fase II, demonstrando o órgão epigonal e rins. **C:** Fase III, demonstrando o órgão epigonal, útero e rins. **D:** Fase IV, órgão localizado próximo aos rins. Nesta imagem as gônadas foram removidas para uma melhor visualização do órgão epigonal. **E:** Adulto, demonstrando a localização anatomica do órgão epigonal.

5.3 ANÁLISES MICROSCÓPICAS

5.1.3 Microscopia dos Órgãos Linfóides

5.1.3.1 Timo

Nos embriões da fase I, foi possível visualizar leucócitos, principalmente linfócitos, na região do timo (Figura 6 A).

Nos embriões da fase II e III, o timo encontra-se revestido por uma capsula de tecido conjuntivo e divisões que constituem os lóbulos. A periferia dos lóbulos apresenta uma coloração mais escura que o centro de cada lóbulo. A camada periférica é chamada de região cortical e a região central, mais clara, é chamada de região medular (Figura 6 B).

Na fase III foi possível notar a presença de linfócitos com cromatina condensada com núcleo basofílico na região cortical e linfócitos com cromatina menos condensada na região medular (Figura 6 C).

Nos embriões da fase IV, o timo é revestido por uma capsula de tecido conjuntivo e divisões que constituem os lóbulos. Há presença de linfócitos com cromatina condensada, com núcleo corado na região cortical e linfócitos com cromatinas menos condensadas na região medular e trabéculas dividindo os lóbulos (Figura 6 D).

Os cortes semifinos corados com azul de toluidina mostram a área de tecido conjuntivo que envolve os lóbulos tímicos, a região cortical e medular bem definida, sendo que a região medular apresentou menos linfócitos que a cortical. Foi possível observar a presença de células reticulares epiteliais na região medular do timo (Figura 6 E).

Nas análises ultraestruturais, observam-se linfócitos tanto com a cromatina condensada como cromatina menos condensada demonstrando diversos tipos de estágios mitóticos de atividade (Figura 6 F).

Figura 6 - Fotomicrografia do timo de Tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP

Legenda: **A:** Fase I, linfócitos de cromatina condensada e outros com cromatina menos condensada, e presença de vaso (V). **B:** Fase II, timo dividido em lóbulos, região cortical e região medular. **C:** Fase III, Região medular e região cortical. **D:** Fase IV, Região cortical e medular, trabécula dividindo os lóbulos. **E:** Fase IV, células reticulares (CR) epiteliais medular do timo (flecha) eritrócitos e vaso. **F:** linfócitos (L) em diversos estágios mitóticos.

5.1.3.2 Órgão de Leydig

O órgão de Leydig não foi localizado nas análises microscópicas das fases I e II.

Nos embriões da fase III, o órgão de Leydig apresenta células linfoides em diferentes estágios de maturação, localizadas abaixo da camada muscular do esôfago (Figura 7 A e 7B).

Em animais da fase IV, o órgão de Leydig apresenta características muito semelhantes aos da fase III, com a presença abundante de leucócitos, como linfócitos em diferentes estágios de maturação (Figura 7 C e D).

Figura 7 - Fotomicrografia do órgão e Leydig de Tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C.E.M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP

Legenda: **A:** Fase III, Epitélio (Ep), musculatura da mucosa (mm), musculo (M), tecido conjuntivo e órgão de Leydig (LY). **B:** Linfócito (Li) e Eritrócito (Er). **C:** órgão de Leydig e Esôfago. **D:** presença de eritrócitos (Er) e linfócitos (Li).

5.1.3.3 Baço

O baço, nos embriões da fase I, apresenta uma cápsula de tecido conjuntivo que envia septos para o interior do órgão dividindo de modo incompleto em lóbulos. Não há formação de nódulos linfoides. Presença de eritrócitos com o citoplasma mais claro e mais escuro e trombocitos, porém não apresenta tecido linfoide denso demarcado (Figura 8 A, B e C).

Nos embriões da Fase II, este órgão apresenta capsula de tecido conjuntivo o qual envia septos para o interior do órgão dividindo de modo incompleto em lóbulos. Formação de nódulos linfoides com presença de linfócitos e neutrófilos. (Figura 8 D, E e F).

Nos animais da Fase III, o baço apresenta uma ramificação lobular, uma uniformidade entre a polpa branca e a polpa vermelha, com presença de linfócitos e eritrócitos (Figura 8 G, H e I).

Nos fetos da Fase IV, este órgão apresenta polpa branca e polpa vermelha delimitada por tecido conjuntivo. Presença de linfócitos e eritrócitos (Figura 8 J, K e L). Tecido conjuntivo envolvendo os lóbulos, eritrócitos, monócitos e linfócios (Figura 8 M, N e O).

No adulto, o baço apresenta cápsula de tecido conjuntivo, polpa vermelha, presença de células reticulares, fibras reticulares e células sanguíneas e polpa branca composta por nódulos linfáticos e linfócitos (Figura P, Q, e R).

Figura 8 - Fotomicrografia do baço de Tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP.

Legenda: **A:** Fase I, capsula (C) de tecido conjuntivo, e lobulos (Lb). **B:** Fase I, Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a presença de eritrócitos (Er) e trombócitos (Tr). **C:** Fase II, presença de lóbulo (Lb) tecido conjuntivo (Tc) e eritrócito (Er). **D:** Fase II, Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a presença de eosinófilos, eritrócitos e linfócitos. **E:** Fase III, Lóbulo do baço, com presença de linfócitos (Li) e eritrócitos (Er). **F:** Fase III, Microscopia eletrônica de transmissão demonstrando a presença de eritrócitos. **G e H:** Fase IV, Polpa branca (Pb) e polpa vermelha (Pv) delimitado por tecido conjuntivo, presença de linfócitos (Li) e eritrócitos (Er). **I e J:** Fase IV, tecido conjuntivo (TC) envolvendo os lóbulos (L), eritrócitos (Er), Monócitos (M) e linfócitos (Li).

5.1.3.4 Órgão Epigonal

Nos animais da fase I foi possível visualizar o início da formação do órgão epigonal, ao redor dos testículos, além da presença de monócitos (Mn), eritrócitos (Er), linfócitos (Li) e neutrófilos (Figura 9 A, B e C).

Nos embriões das fases II, III e IV foi possível observar a presença de linfócitos e eritrócitos em todo o órgão epigonal (figura 9 D, E, G e H). Ultraestruturalmente foi confirmada a presença de eritrócitos, junto com trombócitos e linfócitos (Figura 9 F e I).

Nos fetos das fases IV e no animal adulto foi possível observar a presença de linfócitos e eritrócitos em todo o órgão epigonal (figura 10 J e K). Ultraestruturalmente foi evidenciada a presença de eritrócitos, trombócitos e linfócitos (Figura 10 L).

No animal adulto, o órgão epigonal se apresentou como um órgão sólido, revestido de tecido epitelial e tecido conjuntivo (TC) revestindo o órgão epigonal (OE) (Figura 10 M). Em maior aumento, foi possível observar células em maturação, com destaque a eritrócitos (Eri) e linfócitos (Li) (Figura 10 N).

Ultraestruturalmente foi possível observar a presença de neutrófilos, evidenciando os grânulos ainda em formação, mais centralizado na célula, o núcleo ainda não é evidente e diferenciado do citoplasma (Figuras 10 O).

Figura 9 - Fotomicrografia do órgão epigonal de Tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais

Foto: (BRUNO, C. E. M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP.

Legenda: **A, B e C:** Fase I, órgão epigonal (círculo vermelho), monócitos (Mn), eritrócitos (Er), linfócitos (Li) e neutrófilos (N). **D, E, F, G, H e I:** Fases I, II e IV, presença de Linfócitos (Li) eritrócito (Er), Trombócito (Tr) e Linfócito (Li).

Figura 9 - Fotomicrografia do órgão epigonal de Tubarão-azul (*Prionace glauca*) nos estágios gestacionais e adulto

Foto: (BRUNO, C.E.M., 2014)

Fonte: Departamento de cirurgia, FMVZ, USP

J, K e L: Fase IV, presença de Linfócitos e eritrócitos, trombócito e linfócito. **M, N e O:** Adulto, presença de Tecido epitelial e conjuntivo (TC), órgão epigonal (OE), eritrócitos (Eri) e linfócitos (Li) e neutrófilo (Ne)

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho permitiu a caracterização morfológica do desenvolvimento embrionário dos órgãos linfoides do tubarão-azul, *Prionace glauca*.

6.1 DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO

Os embriões de tubarão-azul em fase I de desenvolvimento embrionário, são considerados estágio gestacional inicial, com ausência de pigmentação em todo o corpo do animal, e na região da cabeça e lateral do corpo coloração mais avermelhada. Região rostral achatada e olhos grandes. O que também é demonstrado no trabalho de Vargas (2009) em estudos com o *Prionace glauca*, onde foram encontradas as mesmas características descritas no trabalho. Isso se deve pelo fato do animal estar em estágio inicial de gestação onde a pigmentação ainda não é presente como descrito por Castro e Wourms (1993) que descrevem em *Rhizoprionodum terranova* que os animais em fase de desenvolvimento inicial também têm pigmentação ausente e a região rostral ainda não se encontra desenvolvida.

Na fase II, o animal apresenta corpo em formato fusiforme. A pigmentação do corpo começa a escurecer, principalmente na região do rosto, cabeça, nas pontas das nadadeiras dorsais e lóbulo superior da nadadeira caudal. Os olhos ainda estão visivelmente mal formados. O rosto apresenta o formato proeminente. Como o animal já está em estágio de desenvolvimento mais avançado começam a apresentar essas características, segundo Vargas (2009) em trabalho com o *P. glauca* onde descreve que os embriões de tubarão azul com tamanhos de 13 cm de comprimento total apresentaram coloração nos ápices das nadadeiras, sendo mais intensos em tubarões com 18 cm como encontrados neste trabalho onde foram analisados animais em torno de 15 a 20 cm de comprimento total. Francis e Stevens (2000) descrevem que essa coloração é mais intensa em *Lamna nasus* em embriões acima de 20 cm. Isso pode ocorrer devido ao período gestacional dessas duas espécies, uma vez que a gestação do tubarão azul é semelhante ao do *Lamna nasus* que dura 8 meses (COMPAGNO, 2003), enquanto o *P. glauca* dura 9 meses.

Porém, embriões de tubarão-anequin (*Isurus oxirhynchus*) apresentam pigmentação na ponta da nadadeira com 40 cm de comprimento total (JOUNG; HSU, 2005). Isso se deve pela gestação dessa espécie de ser mais longa que a do *P. glauca*, sendo de 15 a 18 meses. Com isso, os animais demoram um tempo maior para se desenvolver, oposto do tubarão azul onde o desenvolvimento é mais rápido.

Na fase III, o animal apresenta pigmentação azul, cobrindo todo dorso do animal, e nadadeiras peitorais e caudais, o ventre é ausente de pigmentação. Olhos já estão do tamanho proporcional ao corpo. Nessa fase os animais ainda não são considerados a termo devido suas características morfológicas, e tamanho descritas por Pratt (1979) onde o autor descreve que o tamanho aproximado dessa espécie ocorre quando o animal está com 45 cm de comprimento total, ou seja, já na fase IV, variando muito com o local do nascimento (VARGAS, 2009). No atlântico, esta espécie pode nascer até com 50 cm de comprimento total (BIGELOW; SHROEDER, 1984).

Na fase IV os animais apresentaram características semelhantes aos adultos, como pigmentação forte, corpo delgado e fusiforme, porém com ausência de dentição evidente, sugerindo que esses animais possuem todas as características de um animal a termo, menos a dentição evidente que segundo Hamlett et al (1993), em *Carcharias taurus* foi evidenciada em embriões com os tamanhos de 40 a 45 cm de comprimento total. Os dentes provavelmente devem ser expostos quando o embrião estiver bem próximo ao nascimento, sendo uma característica importante para a sobrevivência do neonato no meio marinho.

6.2 MACROSCOPIA ÓRGÃOS LINFOIDES:

O timo em embriões das fases I e II não é visível macroscopicamente. Podendo somente ser observado na dissecação da musculatura e dos arcos branquiais. Esses órgãos são evidenciados a partir da fase III e IV, onde é anatomicamente localizado na região dorsal do animal, acima do condocrânio, caudalmente aos olhos, iniciando alguns centímetros antes do primeiro arco branquial e se estendendo até a região do quinto arco. É protegido por uma fina

membrana translúcida de tecido conjuntivo que envolve todos os lóbulos em desenvolvimento. Segundo Zapata (1980) a localização anatômica desse órgão pode estar relacionada com o crescimento somático do animal, como evidenciado em estudos realizados com as raias *R. clavata* e *T. marmorata*. Em fetos e neonatos o timo é evidente, porém com o crescimento do animal e o aumento da massa muscular na região onde o timo está localizado, a visualização se torna mais difícil (ZAPATA, 1980). Por serem animais em fase de desenvolvimento embrionário, a localização anatômica do timo pode variar conforme o crescimento do animal e o crescimento da musculatura e do animal podem prejudicar sua localização macroscópica.

No adulto, o timo não é encontrado, sendo visível apenas tecido muscular e os arcos branquiais. Nesta região observou-se uma camada fina de pele, com uma camada de tecido adiposo subjacente e uma densa camada muscular, não sendo possível, portanto localizar o timo ou qualquer resquício deste órgão. Isso ocorre provavelmente porque nos mamíferos, o timo involui e em algumas espécies de teleosteos com o crescimento do animal (ABELLI et al., 1998). Essa característica também pode variar com as mudanças sazonais e com os ciclos hormonais dos peixes (NAKANISHI, 1986). No adulto do tubarão azul, essa característica pode ser explicada pelo aumento da massa muscular na região que o timo está localizado o que dificulta sua localização devido a sobreposição de músculos.

O órgão de Leydig nos animais na fase I, não é perceptível, apresentando a mesma coloração de todo o trato digestório. Embriões na fase II apresentam uma formação avermelhada entre a região do esôfago, e o início do estômago. Segundo Carrier et al. (2004) o órgão de Leydig começa a aparecer durante a quinta semana de desenvolvimento embrionário. Porém, animais na fase III apresentam uma massa branca entre a região do esôfago e região posterior do estômago. Nos espécimes da fase IV, nota-se uma discreta faixa de coloração levemente mais escura, segundo Mattson e Fänge (1982), esse órgão é constituído de duas massas esbranquiçadas localizadas na região do esôfago, o que pode sugerir que nessa fase de desenvolvimento houve um aumento na vascularização do órgão, evidenciado pela pigmentação avermelhada. Uma vez que o órgão de Leydig não foi evidenciado como descrito na literatura, fez-se necessário a confirmação por cortes histológicos,

que demonstraram a presença evidente desse órgão nas duas últimas fases de desenvolvimento embrionário.

O órgão de Leydig não pode ser visualizado macroscopicamente no tubarão adulto, apresentando uma ausência das características desse órgão como sendo uma massa esbranquiçada ao redor do esôfago, que se estende dorsalmente desde a região ventral da boca até a região cárdica do estômago, como evidenciado nos trabalhos de (LUER, et al., 1995; HAMLETT, 1999; SMITH; MARTIN; FLAJNIK, 2015). Segundo Hamlett (1999) esse órgão em *P. glauca* pode ser pequeno ou ausente, porém essa afirmação não é descrita como essas características sendo relacionadas a animais adultos ou embriões. Isso se deve provavelmente ao fato de que no tubarão azul, o órgão de Leydig pode se tornar um órgão sem função quando o animal é adulto.

O baço está localizado na região peritonal, é um órgão alongado, anatomicamente posicionado ao longo do estômago, percorrendo toda a região cárdica e pilórica. Estes dados são semelhantes aos observados por Zapata (1980), que descreve o baço dos tubarões como sendo um órgão alongado e anatomicamente posicionado ao longo da margem exterior do estômago. No tubarão-azul o baço é inteiramente lobado, o que corrobora com os achados de Carrier (2004), que descreve o baço do tubarão-lixo como sendo um órgão inteiramente lobado apresentando pequenos lóbulos em sua extensão.

Na fase de desenvolvimento embrionário I e II, o baço não apresenta pigmentação, mas já é possível notar a formação de pequenos lóbulos. A partir da fase III o baço começa a apresentar uma pigmentação mais arroxeada em toda sua extensão. Segundo Smith, Martin e Flajnik (2015), o baço apresenta coloração arroxeada em todas as espécies de elasmobrânquios. Isso se deve por ser um órgão com grande concentração de sangue, uma vez que esse órgão é responsável pela remoção de células sanguíneas envelhecidas e nessa fase os embriões já produzem células sanguíneas para nutrir os tecidos corporais.

O órgão epigonal se encontra contínuo caudalmente, a partir da margem posterior das gônadas. Na fase I o órgão epigonal apresenta uma membrana muito fina e transparente, sendo muito difícil evidenciar macroscopicamente sua localização anatômica, na fase II o órgão já começa a ser de fácil identificação, possui formato de fita longa e fina, com ausência de coloração por toda sua

extensão. Na fase III e IV e no adulto o órgão se apresenta mais espesso, com coloração esbranquiçada mesmo em animais recém eutanasiados, apresenta dimensões semelhantes por toda sua extensão. Esse órgão está intimamente ligado às gônadas masculinas ou femininas. O órgão epigonal é um órgão longo e regular que percorre toda a extensão das gônadas, visto também nos animais da fase III, IV e adulto. Corroborando com os achados de Pratt (1979), que descreve o órgão epigonal do tubarão azul como sendo achatado e longo em extensão ao seu corpo. Este órgão possui uma função importante na hematopoiese, uma vez que os tubarões não possuem medula óssea. Segundo Lloyd-Evans (1993) e Carrier et al. (2004) esse órgão varia a forma e tamanho entre as espécies. Isso ocorre provavelmente por ser um comportamento normal do órgão para se rearranjar na cavidade celomática do animal, tendo uma variação anatômica entre tubarões e raias.

6.3 MICROSCOPIA DOS ÓRGÃOS LINFOIDES:

O timo na fase I apresentou início de formação de uma massa de células linfóides com células em fase de diferenciação. Segundo Lloyd-Evans (1993) e Carrier et al. (2004), durante a embriogenese, esse órgão é o primeiro a se formar derivando da parede dorsal a partir da segunda e quinta bolsa faríngea. Na fase II apresentou tecido conjuntivo envolvendo o órgão que ainda está em formação, apresenta regiões medulares e corticais ainda em diferenciação, demonstrando que essas regiões estão em fase de diferenciação celular ainda não diferenciada em região cortical e medular, assim como nos achados de Lloyd-Evans (1993) que descreve em teleósteos o timo não se apresenta organizado em regiões corticais e medulares até o final do primeiro trimestre de desenvolvimento. Na fase III, o timo apresentou início da divisão do órgão em lóbulos tímicos, demonstrando o início de migração celular para a capsula tímica com presença de epitélio e tecido conjuntivo revestindo todo o órgão. O órgão apresenta linfócitos em fase de maturação, eosinófilos e macrófagos. Nos teleósteos a divisão do timo em lóbulos ocorre a partir da quinta semana de desenvolvimento, onde os lóbulos se separam a partir do

epitélio da faringe, crescendo lateralmente formando futuramente uma massa continua de lóbulos (LLOYD-EVANS, 1993; CARRIER et al., 2004).

Na fase IV o timo dos elasmobrânquios é envolto em uma cápsula de tecido conjuntivo e disposta em lóbulos distintos separados por trabéculas contínuas ao tecido conjuntivo que encapsulam o órgão. Foi possível observar também que o timo possui uma região medular contendo poucos timócitos e uma região cortical onde foram observadas áreas mais populosas de timócitos, (WEKERLE et al., 1980; DE WAAL MALEFIJT et al., 1986; WEBB et al., 2004). As regiões cortical e medular possuem timócitos em tamanhos variados, e em diferentes estádios de maturação, e que apenas uma pequena porcentagem vai completar a sua maturação antes de serem liberados para a circulação periférica como linfócitos derivados do timo (linfócitos T) (LUER et al., 2005). Essas características são distintas de alguns peixes teleósteos como *Piaractus mesopotamicus*, onde não é possível ter uma clara distinção entre região medular e cortical (COSTA, 2007).

Ultraestruturalmente foi possível visualizar células linfoides em fase mitótica, achado, corroborando com Luer et al. (2005), que descreve a presença de células em profase/metáfase são regularmente observadas no tecido tímico.

O órgão de Leydig foi encontrado nas fases II onde foi possível observar a presença de epitélio, musculatura da mucosa, músculo e tecido conjuntivo revestindo a luz do esôfago nas cercanias do órgão. O órgão de Leydig é constituído por uma população de células, se diferenciando totalmente do restante dos tecidos adjacentes. Nas fases III e IV, foi possível visualizar a presença de epitélio pavimentoso simples revestindo a luz do esôfago e o órgão de Leydig com presença de células em estágio de maturação com destaque em eritrócitos e linfócitos e macrófagos. Segundo Smith et al. (2015), esse órgão possui grande população de leucócitos em diversas fases de maturação, bem como a presença de linfócitos e granulócitos. A presença de grande população de eritrócitos demonstra os achados de Oguri (1983) que descreve o órgão de Leydig como um dos órgãos hematopoiéticos dos elasmobrânquios, bem como a produção de linfócitos que são produzidos na medula óssea (MESQUITA-JUNIOR et al., 2010). A presença de granulócitos sugere que esse órgão tem papel semelhante ao órgão epigonal uma vez que essas células são encontradas em significativas quantidades nesse órgão

(FÄNGE; MATTISON, 1981; ZAPATA, 1980; CARRIER et al., 2004; SMITH et al., 2004).

O animal adulto não apresentou órgão de Leydig, demonstrando apenas uma camada de tecido conjuntivo relacionado ao esôfago; segundo Hamlett (1999) esse órgão é ausente ou muito pequeno para espécies como o *Prionace glauca* e *Ginglymostoma cirratum*, porém o autor não descreve a fase de desenvolvimento do animal. Esse órgão provavelmente pode perder a sua funcionalidade quando o animal é adulto, sendo substituído pelo órgão epigonal, que também possui a mesma função corroborando com o trabalho de Honma et al (1984), que também observou diversas células hematopoiéticas no órgão epigonal, sugerindo assim, que o órgão de Leydig é um importante produtor de células sanguíneas. Somado a isso, por ter um órgão epigonal largo e extenso, provavelmente o órgão de Leydig não seja necessário no animal adulto. Segundo Fanger (1977), o órgão de Leydig pode compensar a falta de tecido quando o tecido linfomielóide do órgão epigonal for limitado.

No baço, a partir da fase I, já é possível identificar sua divisão em lóbulos, com a presença de linfócitos; na fase II, a presença de epitélio pavimentoso simples revestindo o tecido conjuntivo e musculatura, demonstrando uma maior complexidade do órgão. Na fase III apresentou tecido conjuntivo ligando os lóbulos com presença de células em estágio de maturação como eritrócitos e linfócitos. Na fase IV e adulto, apresentou regiões de polpa branca e vermelha. O baço do *P. glauca* se assemelha ao de outros elasmobrânquios e de alguns mamíferos (FÄNGE; NILSSON, 1985), sendo também formado por regiões com polpa vermelha e polpa branca (ZAPATA, 1980). As células sanguíneas e os leucócitos encontrados reforçam a hipótese de que o baço do *Prionace glauca* possui função de armazenamento e maturação de algumas células de defesa e eritropoiéticas (LIU et al., 2004). Andrew e Hickman (1974) relataram que as regiões dispersas de polpa branca são aglomerações densas de pequenos linfócitos, e cercadas por áreas menos densas de polpa vermelha contendo seios venosos. Ao invés de serem preenchidas com linfa, como em mamíferos, estas cavidades são preenchidas principalmente por eritrócitos e, em menor medida, por linfócitos.

Na fase I foi possível visualizar o início da formação do órgão epigonal, ao redor formação inicial dos testículos corroborando com os dados de Lloyd-Evans (1993) que descreve esse órgão como sendo intimamente associado ao mesentério em que ocorre o desenvolvimento gonadal. Nas fases II, III e IV e adulto foi possível observar a presença de linfócitos e eritrócitos, monócitos, neutrófilos, trombócitos e leucócitos em todo o órgão epigonal. A quantidade de eritrócitos se sobressairam em comparação às outras células por se tratar do principal órgão hematopoiético dos elasmobranchios. Entretanto, a presença de células imunológicas corrobora com os achados de Fänge e Mattison (1981); Zapata (1980); Carrier et al. (2004) e Smith et al. (2004), que demonstram grande quantidade de leucócitos em diversos estágios de desenvolvimento e presença de granulócitos, evidência que esse órgão também possui função imunológica

No animal adulto, o órgão epigonal se apresentou como um órgão sólido, revestido de tecido epitelial e tecido conjuntivo. Em maior aumento, foi possível observar células em maturação, com destaque a eritrócitos e linfócitos. Bircan-Yldirim et al. (2011), em estudos com *Rhinobatos rhinobatos*, descreve que a atividade mitótica dos eritrócitos é frequentemente detectada no órgão epigonal, demonstrando que a replicação, bem como a maturação destas células ocorrem regularmente neste órgão. Ultraestruturalmente foi possível observar a presença também de neutrófilos, evidenciando os grânulos ainda em formação, mais centralizado na célula com um núcleo ainda não é evidente e diferenciado do citoplasma. Essas observações mostram a importância deste órgão quanto à sua função imunológica e hematopoiética.

O tubarão azul mostrou em todo o seu desenvolvimento embrionário uma grande capacidade de adaptação do seu sistema imunológico, principalmente com a perda de órgãos linfoides como o timo e o órgão de Leydig, sendo substituído por outros órgãos com a mesma função como é o caso do órgão de Epigonal que substitui o Leydig no final da embriogenese e fase adulta do animal.

7 CONCLUSÕES

- O timo, nos estágios I (5 a 10 cm), II (15 a 20 cm), não foi observado macroscopicamente, sendo visível nas fases III (25 a 35 cm) e IV (40 a 45 cm). Porém em todas as fases o timo estava presente quando visto microscopicamente. Na fase adulta (2 a 3 m), o timo se mostrou ausente tanto na observação macroscópica quanto microscópica.

- O órgão de Leydig foi encontrado somente na fase embrionária, a partir da fase II até a fase IV, se apresentando como uma população de células linfoides intimamente aderidas ao lumen do esôfago, sendo de fácil visualização microscópica. Esse órgão não foi evidenciado nos animais em fase adulta, demonstrando que sua função pode ser perdida devido a maturação e aumento do órgão epigonal.

- A semelhanças de outras classes de peixes e dos mamíferos, o baço do *P. glauca* se apresentou lobado, evidenciando células linfomielóides em diversas fases de maturação possuindo regiões de polpa branca e regiões de polpa vermelha. Está presente desde a fase embrionária até a fase adulta.

- O órgão epigonal foi evidenciado em todas as fases embrionárias do *P. glauca* inclusive no animal adulto. Caracterizou-se principalmente por seu aspecto de fita bastante aderido às gônadas e pela presença de leucócitos. Demonstrou ter função imunológica e hematopoiética em todo o desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- ABELLI, L.; PICCHIETTI, S.; ROMANO, N.; MASTROLIA, L.; SCAPOGLIATI, G. Immunocytochemical detection of a thymocyte antigenic determinant in developing lymphoid organs of sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L). **Fish Shellfish Immunology**, v. 6, p. 463-505, 1996.
- ABELLI, L.; BALDASSINI, M. R.; MESCHINI, R.; MASTROLIA, L. Apoptosis of thymocytes in developing sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Fish Shellfish Immunology**, v. 8, p. 13–24, 1998.
- AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**, v. 191, p. 11–31, 1980.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, v. 24, p. 471–488, 1984.
- AMORIM, A. F. **Estudo da biologia da pesca e reprodução do Cação-Azul *Prionace glauca* L. 1758, capturados no sudeste e sul do Brasil**. 1992. 205 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 1992.
- ANDERSON, G.; LANE, P. J.; JENKINSON, E. J. Generating intrathymic microenvironments to establish T-cell tolerance. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 954–963, 2007.
- ANDREW, W.; HICKMAN, C. P. **Histology of the vertebrates**: a comparative text. St Luis: Mosby Company, 1974.
- AVILÉS-TRIGUEROS, M.; QUESADA, J. A. Presence of interdigitating cells in thymus of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L. (Teleost). **Journal of Morphology**, v. 224, p. 199–203, 1995.
- BAJOGHLI, B.; GUO, P.; AQHAALLAEI, N.; HIRANO, M.; STROHMEIER, C.; MCCURLEY, N.; BOCKMAN, D. E.; SCHORPP, M.; COOPER, M. D.; BOEHM, T. A thymus candidate in lampreys. **Nature**, v. 470, p. 90–94, 2011.
- Bessis, M. Red Cell Shapes. An illustrative classification and its rationale. In: BESSIS, M.; WEED, R. I.; LEBLOND, P. F. (Ed.). **Red cell shape**. New York: Springer-Verlag, 1973. p. 1-25.
- BIRCAN-YILDIRIM, Y.; ÇEK, Ş.; BAŞUSTA, N.; ATIK, E. Histology and morphology of the epigonal organ with special reference to the lymphomyeloid system in *Rhinobatos rhinobatos*. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 11, p. 351-358, 2011.

BOEHM, T. Design principles of adaptive immune systems. **National Review of Immunology**, v. 11, p. 307–317, 2010.

BOEHM, T.; HESS, I.; SWANN, J. B. Structure and function of lymphoid tissues Evolution of lymphoid tissues. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 6, p. , 2012.

BONE, Q.; MOORE, R. H. **Biology of fishes**. 3. ed. Nova York: Taylor & Francis, 2008.

BORNATOWSKI, H.; SCHWINGEL, P. R. Alimentação e reprodução do tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus 1758), capturado na costa sudeste e sul do Brasil. **Arquivos de Ciência do Mar**, v. 41, n. 1, p. 98-103, 2008.

BOWDEN, T. J.; COOK, P.; ROMBOUT, J. H. Development and function of the thymus in teleosts. **Fish Shellfish Immunology**, v. 19, p. 413–427, 2005.

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

BRENDOLAN, A.; ROSADO, M. M.; CARSETTI, R.; SELLERI, L.; DEAR, T. N. Development and function of the mammalian spleen. **Bioessays**, v. 29, p. 166–177, 2007.

BREUIL, G.; VASSILOGLOU, B.; PEPIN, J. F.; ROMESTAND, B. Ontogeny of IgM-bearing cells and changes in the immunoglobulin M-like protein level (IgM) during larval stages in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Fish Shellfish Immunology**, v. 7, p. 29-43, 1997.

BUENTELLO, J. A.; GATLIN, D. M. Nitric oxide production in activated macrophages from channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influence of dietary arginine and culture media. **Aquaculture**, v. 179, p. 513–521, 1999.

BUETTNER, M.; PABST, R.; BODE, U. Stromal cell heterogeneity in lymphoid organs. **Trends in Immunology**, v. 31, p. 80–86, 2010.

CAMPANA, S. E.; JOYCE, W.; FRANCIS, M. P.; MANNING, M. J. Comparability of blue shark mortality estimates for the Atlantic and Pacific longline fisheries. **Marine Ecology Progress Series**, Kilbirnie, v. 396, p. 161-164, 2009.

CARRIER, J.C.; MUSICK, J. A.; HEITHAUS, M. R. **Biology of sharks and their relatives**. Florida: Boca Raton, 2004.

CASTRO, J. I.; WOURMS, P. Reproduction, placentation and embryonic development of the atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. **Journal of Morphology**, v. 218, p. 257-280, 1993.

CHANTANACHOOKHIN, C.; SEIKAI, T.; TANAKA, M. Comparative study of the ontogeny of the lymphoid organs in three species of marine fish. **Aquaculture**, v. 99, p. 143-155, 1991.

CHILMONCZYK, S. The thymus in fish: development and possible function in the immune response. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 181–200, 1992.

CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A. I. Acid–base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 293, p. 302–319, 2002.

COMPAGNO, L. J. V. **Sharks and order Carcharhiniformes**, Princeton: Caldwell, 2003.

COSTA, G. M. **Estudos histomorfológicos e análise dos perfis celulares do rim cefálico, fígado, baço e timo do *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887, Teleosteo, Characidae), Pacu**. 2007. 134 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2007

DANNEVING, B. H.; LAUVE, A.; PRESS, C.; LANDSVERK, T. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. **Fish Shellfish Immunol**, v. 4, p. 3-18, 1994.

DE WAAL MALEFIJT, R.; LEENE, W.; ROHOLL, P. J. M.; WORMMEESTER, J.; and HOEBEN, K.A..T cell differentiation within thymic nurse cells. **Laboratory Investigation**.Vol. 55 pp. 25–34.1986

DOMINGO, A.; MORA, O.; CORNES, M. Evolución de las capturas de elasmobranquios pelágicos en la pesquería de atunes de Uruguay, con énfasis en los Tiburones Azul (*Prionace glauca*), Moro (*Isurus oxyrinchus*) y Porbeagle (*Lamna nasus*). **Collective Volume Scientific Papers, ICCAT**, v. 54, n. 4. p. 1406-1420, 2002.

DOS SANTOS, N. M.; ROMANO, N.; SOUSA, M.; ELLIS, A. E.; ROMBOUT, J. H. Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L). **Fish Shellfish Immunology**, v. 10, p. 583-596, 2000.

ELLIS, A. E. Ontogeny of the immune response in *Salmo salar*. Histogenesis of the lymphoid organs and appearance of membrane immunoglobulin and mixed leucocyte reactivity. In: SOLOMON, J. B.; HORTON, J. D. (Ed.). **Developmental immunobiology**. Amsterdam: Elsevier, 1977. p. 225-231.

ELLIS, A. E.; DE SOUSA, M. A. B. Phylogeny of the lymphoid system. I. A study of the fate of circulating lymphocytes in plaice. **European Journal of Immunology**, v. 4, p. 338–343, 1974.

ELLIS, A. E.; ROBERTS, R. J. **The anatomy and physiology of teleosts**. London: Baillière Tindall, 1989.

EVANS, D. L.; JASO-FRIEDMANN, L. Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 109–121, 1992.

FÄNGE, R.; MATTISSON, A. The lymphomyeloid (hemopoietic) system of the atlantic nurse shark, *Ginglymostoma cirratum*. **The Biological Bulletin**, v. 160, p. 240-249, 1981.

FÄNGE, R.; NILSSON, S. The fish spleen: Structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, V. 41, p. 152–158, 1982.

FÄNGE, R.; NILSSON, S. The fish spleen: Structure and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, V. 41, p. 152–158, 1985.

FERGUSON, H. W. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 86, p. 377–380, 1976.

FIGUEIREDO, J. L. **Manual de peixes marinhos do Brasil**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 1977. 104 p.

FINSTAD, J.; GOOD, R. A. Evolution of the immune response III Immunologic responses in the lamprey. **Journal of Experimental Medicine**, v. 120, p. 1151-1168, 1964.

FRANCIS, M. P.; STEVENS, J. D. Reproduction, embryonic development, and growth of the porbeagle shark, *Lamna nasus*, in the southwest Pacific Ocean. **Fish Bull**, v. 98, p. 41-63, 2000.

GALLOWAY, J.L.; ZON, L.I. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. **Curr. Top. Dev. Biol.** V. 53, p 139-158, 2003

GE, Q.; ZHAO, Y. Evolution of thymus organogenesis. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 39, p. 85–90, 2013.

GREVELLEC, A.; TUCKER, A. S. THE pharyngeal pouches and clefts: development, evolution, structure and derivatives. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 325–332, 2010.

GUBANOV, Y.; GRIGOR'YEV, V. N. Observations on the distribution and biology of the blue shark *Prionace glauca* (Carcharhinidae) of the Indian Ocean. **Journal of Ichthyology**, v. 15, p. 37-43, 1975.

HAMLETT, W. C. **Reproductive biology of south american vertebrates**. Nova York: Springer-Verlag, 1993.

HAMLETT, W. C. **Sharks,skates and rays.The biology of elasmobranch fishes**. Maryland: Johns Hopkins University, 1999.

HANSEN, J. D.; ZAPATA, A. G. Lymphocyte development in fish and amphibians. **Immunological Reviews**, v. 166, p. 199–220, 1998.

HAZIN, F.; LESSA, R. Synopsis of biological information available on Blue Shark, *Prionace glauca*, from the Southwestern Atlantic Ocean. **Collective Volume Scientific Papers, ICCAT**, v. 58, n. 3, p. 1179-1187. 2005.

HERRAEZ, M. P.; ZAPATA, A. G. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 117–126, 1986.

HONMA, Y.; TAMURA, E. Histological changes in the lymphoid system of fish with respect to age, seasonal and endocrine changes. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 3, p. 239-244, 1984.

HYDER, S. L.; CAYER, M. L.; PETTEY, C. L. Cell types in the peripheral blood of the nurse shark: An approach to structure and function. **Tissue and Cell**, v. 15, p. 437–455, 1983.

JOSEFSSON, S.; TATNER, M. F. Histogenesis of the lymphoid organs in sea bream (*Sparus aurata*, L). **Fish Shellfish Immunology**, v. 3, p. 35-49, 1993.

JOUNG, S. J.; HSU, H. H. Reproduction and embryonic development of the shortfin mako, *Isurus oxyrinchus rafinesque*, 1810, in the Northwestern Pacific. **Zoological Studies**, v. 44, n. 4, p. 487-496, 2005.

KAATTARI, S.; IRWIN, M. J. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 9, p. 433-444, 1985.

KOHLER, N.; TURNER, P.; HOEY, J.; NATANSON, L.; BRIGGS, R. Tag and recapture data for three pelagic shark species, blue shark (*Prionace glauca*), shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*), and porbeagle (*Lamna nasus*) in the North Atlantic Ocean. **Collection Volume of Scientific Papers**, v. 54, n. 4, p. 1231-1260, 2002.

KOTAS, J. E.; LIN, C. F.; ALBANEZ, F. F. Observações biológicas do tubarão-azul, *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758), em cruzeiros de prospecção pesqueira na zona econômica exclusiva do Sudeste-Sul do Brasil. **Revista CEPSUL - Biodiversidade e Conservação Marinha**, v. 1, n. 1, p. 43-60, 2010.

LAM, S. H.; CHUA, H. L.; GONG, Z.; WEN, Z.; LAM, T. J.; SIN, Y. M. Morphologic transformation of the thymus in developing zebrafish. **Developmental Dynamics**, v. 225, p. 87-94, 2002.

LE DOUARIN, N. M.; DIETERLEN-LIEVRE, F.; OLIVER, P. D. Ontogeny of primary lymphoid organs and lymphoid stem cells. **American Journal of Anatomy**, v. 170, p. 261–299, 1984.

LEGAT, J. F. A.; VOOREN, C. M. Distribuição e abundância relativa do Tubarão-Azul, *Prionace glauca*, no sul do Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 34, n. 3, p. 425-432, 2008.

LESSA, R.; SANTANA, F. M.; RINCÓN, G.; GADIG, O. B. F.; EL-DEIR, A. C. A. **Biodiversidade de elasmobrânquios no Brasil**. Recife-PE: Necton, Projeto de conservação e utilização sustentável da diversidade biológica Brasileira (PROBIO), 1999.

LIEM, K.; BEMIS, W.; WALKER, W. F.; GRANDE, L. **Functional anatomy of the vertebrates: an evolutionary perspective**. 3. ed. Belmont: Brooks Cole, 2001.

LITMAN, R.; FINSTON, A.L.; WILLIAMS, E.T. Evaluation of sample pretreatment for mercury determination. **Anal. Cherm.** v. 47, p. 2364-2369, 1975.

LIU, Y.; ZHANG, S.; JIANG, G.; YANG, D.; LIAN, J.; YANG, Y. The development of the lymphoid organs of flounder, *Paralichthys olivaceus*, from hatching to 13 months. **Fish Shellfish Immunology**, v. 16, p. 621-632, 2004.

LLOYD-EVANS, P. Development of the lymphomyeloid system in the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 17, p. 501-514, 1993.

LUER, C. A.; WALSH, C. J.; BODINE, A. B.; WYFFELS, J. T.; SCOTT, T. R. The elasmobranch thymus: Anatomical, histological, and preliminary functional characterization. **Journal of Experimental Zoology**, v. 273, p. 342-354, 1995.

MAISEY, K.; IMARAI, M. Diversity of teleost leukocyte molecules: Role of alternative splicing. **Fish & Shellfish Immunol.**, v. 31, p. 663-672, 2010.

MANNING, M. J.; NAKANISHI, T. The specific immune system: cellular defences - Effect of temperature. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system. Organism, pathogen and environment**. [S.l.]: Academic Press, p. 183-185. 1996.

MARCHARLONIS, J. J. **Immunity in evolution**. [S.l.]: Harvard University Press, 1977.

MATTSON, A.; FANGE, R. The cellular structure of the Leydig organ in the shark, *Etmopterus spinax* (L.). **The Biological Bulletin**, v. 162, p. 182-194, 1982.

MATOS, M. S.; MATOS, P. F. de. **Laboratório clínico médico-veterinário**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. 238 p.

MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; GARCÍA-AYALA, A. Retículo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L): an ultrastructural and cytochemical study. **Anatomical Record**, v. 241, p. 303-309, 1995.

MESQUITA-JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; CRUVINEL, W.M.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Sistema imunitário – Parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.50, n. 6, p. 552-580, 2010

MILLER, N. W.; SIZEMORE, R. C.; CLEM, L. W. The phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular response for in vitro antibody responses of channel catfish leukocytes. **Journal of Immunology**, v. 133, p. 2356–2359, 1985.

MILLER, N. W. Immunology of fishes. Leukocytes and their markers. In: falta autor do livro. **Handbook of Vertebrate Immunology**. London: Academic Press, 1998.

MOURATO, B. L. **Padronização da captura por unidade de esforço de espadarte, *Xiphias gladius* L., 1758 e de Tubarão-Azul, *Prionace glauca* (L., 1758) capturados pela frota atuneira brasileira no Oceano Atlântico**. 2007. 91 p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesca, Santos/SP, 2007.

MULERO, T.; GARCIA-AYALA, A.; MESEGUER, J.; MULERO, V. Maternal transfer of immunity and ontogeny of autologous immunocompetence of fish: a minireview. **Aquaculture**, v. 268, p. 244-250, 2007.

NAKANISHI, T. Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissue of the marine teleost, *Sebastes marmoratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, p. 213–221, 1986.

NAKANO, H.; SEKI, M. P. Synopsis of biological data on the blue shark *Prionace glauca* Linnaeus. **Bulletin of Fisheries Research Agency**, v. 6, p. 18-55, 2003.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 600 p.

OGURI, M. On the Leydig organ in the esophagus of some elasmobranchs. **Bull. Japanese Society of Scientific Fisheries**, v. 49, n. 7, p. 989-991, 1983.

PADRÓS, F.; CRESPO, S. Ontogeny of the lymphoid organs in the turbot *Scophthalmus maximus*: a light and electronmicroscope study. **Aquaculture**, v. 144, p. 1-16, 1996.

PASTORET, P. P.; GRIEBEL, P.; BAZIN, H.; GOVAERTS, A. **Handbook of vertebrate immunology**. Londres: Editora Academica, 1998.

PETRIE, H. T.; ZUNIGA-PFLUKER, J. C. Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 649–679, 2007.

PINZÓN, E. V. V.; ALDANA, L. M. Morfología comparativa de las células sanguíneas del tiburón nodriza *Inglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788) con diversos peces. **Dahlia**, v. 1, p. 97-102, 1996.

PRATT JR., H. L. Reproduction in the blue shark, *Prionace glauca*. **Fishery Bulletin**, v. 77, n. 2, p. 445-470, 1979.

PRESS, C. M. C. L.; EVENSEN, O. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish Shellfish Immunology**, v. 9, p. 309–318, 1999.

QUAGGIO, A. L. C.; KOTAS, J. E.; HOSTIM, M. As capturas do tubarão-azul, *Prionace glauca* Linnaeus (Elasmobranchii, Carcharhinidae), na pescaria de espinhel de superfície (monofilamento), sediada em Itajaí (SC), Brasil. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 3, n. 1, p. 61-74, 2008.

RANZANI-PAIVA, M. T. J.; SILVA-SOUZA, A. T. **Hematologia de peixes brasileiros**. São Paulo: Editora Varela, 2004.

RAZQUIN, B. E.; CASTILLO, A.; LÓPEZ, P.; ALVAREZ, F.; ZAPATA, A.; VILLENA, A. J. Ontogeny of IgM-producing cells in the lymphoid organs of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson: an immune- and enzyme histochemical study. **Journal of Fish Biology**, v. 36, p. 159-173, 1990.

REITE, O. B. Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. **Fish Shellfish Immunology**, v. 8, p. 489–513, 1998.

ROBERTS, R. J. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. In: RIBELIN, W. E.; MIGAKI, G. (Ed.). **The pathology of fishes**. Madison: Wisconsin Press, 1975. p. 399–428.

RODEWALD, H. R. Thymus organogenesis. **Annual Review of Immunology**, v. 26, n. 355–388, 2008.

ROMANO, N.; TAVERNE-THIELE, A.J.; FANELLI, M.; BALDASSINI, M.R.; ABELLI, L.; Mastrolia L.; VAN MUISWINKEL, W. B.; ROMBOUT, J. H. Ontogeny of the thymus in a teleost fish, *Cyprinus carpio* L.: developing thymocytes in the epithelial microenvironment. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, p. 123-137, 1999.

ROMBOUT, J. H. W. M.; HUTTENHUIS, H. B. T.; PICCHIETTI, S.; SCAPIGLIATI, G. Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. **Fish Shellfish Immunology**. v. 19, p. 441-455, 2005.

ROWLEY, A. F.; HUNT, T. C.; PAGE, M.; MAINWARING, G. **Vertebrate blood cells**. Cambridge: Cambridge University Press, 1988.

RUMFELT, L. L.; MCKINNEY, E. C.; TAYLOR, E.; FLAINIK, M. F. The development of primary and secondary lymphoid tissues in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*: B-cell zones precede dendritic cell immigration and T-cell zone formation during ontogeny of the spleen. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 56, p. 130–148, 2002.

SATAKE, F.; PÁDUA, S. B.; ISHIKAWA, M. M. Distúrbios morfológicos em células sanguíneas de peixes em cultivo: uma ferramenta prognóstica. In: TAVARES-DIAS, M. (Org.). **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: Embrapa Amapá, 2009. p. 330-345.

SCHWINGEL, P. R.; MAZZOLENI, R. C. Aspectos da biologia das espécies capturadas por espinhel pelágico na costa sul do Brasil no inverno de 2001. **Notas Técnicas FACIMAR**, n. 8, p. 75-82, 2004.

SCHRODER, M. B.; VILLENA, A. J.; JORGENSEN, T. O. Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). **Developmental and Comparative Immunology**, v. 22, p. 507-517, 1998.

SMITH, M.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. **The elasmobranch husbandry manual**: captive care of sharks, rays and their relatives. Ohio: Ohio Biological Survey, 2004.

SMITH, S. L.; SIM, R. B.; FLAJNIK, M. F. **Immunobiology of the shark**. 1. ed. [S.l.]: CRC Press, 2015.

SCAPIGLIATI, G.; ROMANO, N.; ABELLI, L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes. **Aquaculture**, v. 172, p. 3-28, 1999.

SUDA, A. Ecological study on the blue shark (*Prionace glauca* Linné). **South Sea Area Fisheries Research Laboratory**, n. 26, p. 1-11, 1953. Supplement 1.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto-SP: Ed. Eletrônica e Arte Final, 2006. 144 p.

TAVARES-DIAS, M.; BARCELLOS, J. F. M. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock, 1828: a morphological and cytochemical study. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, n. 4, p. 215-220, 2005.

TORT, L.; BALASCH, J.C.; MACKENZIE. Fish immune system: a crossroads between innate and adaptive responses. **Immunologia**, v. 22, n. 3, p. 277-286, 2003.

THRALL, Mary. A **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007.

TSUJII, T.; SENO, S. Melano-macrophage centers in the aglomerular kidney of the sea horse (Teleost): morphologic studies on its formation and possible function. **The Anatomical Record**, v. 226, p. 460-470, 1990.

VALEIRAS, J. ABAD, E., **Manual de ICCAT - Comisión Internacional para la conservación del atún Atlántico**. Espanha: ICCAT, 2009.

VARGAS, O. U. M. **Descripción del desarrollo embrionario del tiburón azul, *Prionace glauca* (LINNAEUS, 1758), en la costa occidental de Baja California**

Sur. 2009. 94 p. Tese (Mestrado) - Posgrado em Ciencias del Mar y Limnologia Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2009.

VASKE-JÚNIOR, T.; RINCÓN-FILHO, G. Conteúdo estomacal dos Tubarões Azul (*Prionace glauca*) e Anequim (*Isurus oxyrinchus*) em águas oceânicas no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 58, n. 3, p. 445-452, 1998.

VASKE-JUNIOR, T.; LESSA, R. P.; GADIG, O. B. F. Feeding habits of the blue shark (*Prionace glauca*) off the coast of Brazil. **Revista Biota Neotrópica**, v. 9, n. 3, p. 55-60, 2009.

WEBB, O.; KELLY, F.; BENITEZ, J.; JUNCHENG, L.; PARKER, M.; MARTINEZ, M.; SAMMS, M.; BLAKE, A.; PEZZANO, M.; GUYDEN, J. The identification of thymic nurse cells in vivo and the role of cytoskeletal proteins in thymocyte internalization. **Cellular Immunology**, v. 228, p.119–129, 2004.

WEKERLE, H.; KETELSEN, U.-E.; ERNST, M. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial cell complexes in murine thymuses: Morphological and serological characterization. **Journal of Experimental Medicine**, v. 151, p. 925–944, 1980.

WALSH, W.; KLEIBER, P. Generalized additive model and regression tree analyses of the blue shark (*Prionace glauca*) catch rates by the Hawaii-based commercial longline fishery. **Rev. Fisheries Research**, v. 53, p. 115-131, 2001.

WALSH, C. J.; LUER, C. A. Elasmobranch hematology: Identification of cell types and practical applications. In: SMITH, M. F. L.; WARMOLTS, D.; THONEY, D.; HUETER, R. **The elasmobranch husbandry manual**: captive care of sharks, rays, and their relatives. Columbus: Ohio Special Publication of The Biological Survey, 2004. p. 307-323.

WHYTE, S. K. The innate immune response of finfish- a review of current knowledge. **Fish Shellfish Immunology**, v. 23, p. 1127–1151, 2007.

WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: a review. **Annual Review of Fish Diseases**, v. 2, p. 91–108, 1992.

WORKENHE, S. T.; RISE, M. L.; KIBENGE, M. J.; KIBENGE, F. S. The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. **Molecular Immunology**, v. 47, p. 2525–2536, 2010.

ZAPATA, A. Ultrastructure of elasmobranch lymphoid tissue.2. Leydigs and epigonal organs. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 4, p. 459-472, 1980.

ZAPATA, A.G.; CHIBÁ, A. Cells and tissues of the immune system of fish. In: IWAMA, G.; NAKANISHI, T. (Ed.). **The fish immune system: organism, pathogen and environment**. [S.l.]: Academic Press, 1986. p. 1-62.

ZAPATA, A.; COOPER, E. L. **The Immune system**: comparative histophysiology. Chichester: John Wiley and Sons, 1990.

ZAPATA, A. G.; CHIBÁ, A.; VARAS, A. **Cells and tissues of the immune system of fish in the fish immune system**: organism pathogen environment. [S.I.]: Academic Press, 1996. p. 1-62.

ZAPATA, A.; DIEZ, B.; CEJALVO, T.; GUTIÉRREZ, F. C.; CORTÉS, A. Ontogeny of the immune system of fish. **Fish Shellfish Immunology**, v. 20, p. 126–136, 2006.