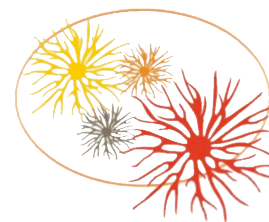




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA



Carolina Reyes Batista

**EFEITOS DA DUPLA TRANSGENIA DO EIXO SOMATOTRÓPICO (GH/GHR) SOBRE ASPECTOS
ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Rio Grande

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Carolina Reyes Batista

**EFEITOS DA DUPLA TRANSGENIA DO EIXO SOMATOTRÓPICO (GH/GHR) SOBRE ASPECTOS
ESTRUTURAIS E MOLECULARES DO SISTEMA IMUNOLÓGICO DO PEIXE-ZEBRA (*Danio rerio*)**

Dissertação de mestrado a ser defendida no âmbito do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas- Fisiologia Animal Comparada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE.

Orientador: Luis Fernando Marins

Co-orientador: Márcio de Azevedo Figueiredo

Rio Grande

2014

“Every great advance in science has issued from a new audacity of imagination.”
John Dewey, *The Quest for Certainty*, 1929

AGRADECIMENTOS

Se fecha mais uma etapa da minha formação acadêmica. Quando iniciei no tão desejado mestrado em Ciências Fisiológicas não tinha ideia de quantos desafios, aprendizados e crescimento que essa etapa me traria. Hoje é com emoção que escrevo estes agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Dr. Luis Fernando Marins que me abriu as portas do laboratório de Biologia Molecular a seis anos atrás. Foram durante as aulas de bioquímica na graduação que a admiração começou: “- Quando crescer quero ser que nem ele!”. Obrigada por me permitir conviver de perto com teu exemplo profissional e participar da tua equipe. Tuas ideologias e mentoria sempre me estimularam a dar o melhor de mim e não ter medo de alçar voos mais altos.

Ao meu querido co-orientador Dr. Márcio Figueiredo que me aceitou como co-orientada. Agradeço pela convivência, por me ajudar a tanto tempo e com tanta paciência. Tua perspicácia e inteligência contribuíram fundamentalmente para meu crescimento. Obrigada por todas as orientações não científicas também, que sempre vieram desse coração enorme.

Agradeço muito ao Prof. Dr. Luis Alberto Romano e a Dra. Elsa Haas do Departamento de Patologia do Hospital Pamenio Pineiro, Buenos Aires, Argentina. Sem o auxílio de vocês as análises histológicas e imunohistoquímicas não seriam possíveis. Obrigada ao Prof. Romano pela atenção e disponibilidade, por contribuir na minha formação como um todo. Agradeço também a Marta Klosterhoff, que me auxiliou no embocamento do material para as análises. Foi um privilégio contar com vocês!

Aos professores que aceitaram o convite de participar da banca: Prof. Dr. Luiz Eduardo Maia Nery e Prof. Dr. Vinícius Farias Campos. As contribuições de vocês serão muito bem-vindas para o aprimoramento deste trabalho.

Agradeço aqueles sem os quais eu não estaria aqui. Aos meus pais Norma e Jorge Batista que me deram a dádiva da vida, me educaram e estimularam. Obrigada por acreditarem em mim independente das circunstâncias. É essa fé que vocês tem em mim que me faz forte para seguir em busca. Agradeço também a minha amada vizinha Alva que não entende muito bem se eu estudo ou trabalho na FURG, realmente é confuso né?! Eu amo vocês!

Ao meu amor, Gustavo Parfitt que caminha ao meu lado na vida e na ciência. Por acreditar em mim e ter me dado forças quando as minhas se acabavam. Por me estender a mão sempre que eu preciso. Obrigada pelo amor, carinho, dedicação e companheirismo. Pela paciência nesses últimos dias pré-defesa. Juntos enfrentaremos muitos desafios mas estaremos seguros porque temos um ao outro. Eu te amo!

As minhas queridas amigas Maiara Marques e Carolina Peixoto que compartilham comigo inúmeros desafios da vida científica e não científica desde a graduação. Com vocês tenho aprendido a ser uma pessoa melhor. Obrigada pela amizade, por serem pontinhos de luz e leveza da minha vida. O carinho, os sorrisos e os abraços de vocês me fazem ser muito feliz. Amo vocês!

Agradeço ao carinho de um casal de amigos fofos: Bruno Cruz e Cristiane Bolico. Obrigada por fazerem eu desopilar muitas vezes e por me proporcionarem momentos de (no mínimo) alegria e descontração! Adoro vocês!

A minha querida amiga Marina Giacomini, que compartilhou tantos momentos maravilhosos (e outros nem tanto) durante o mestrado. São muitas histórias! Sinto muito tua falta mas entendo, a vida é boa mesmo aí no Canadá! Tu mora dentro do meu coração!

Ao meu amigo Bruno Oliveira, que sempre admirei pela inteligência e interesse científico, desde a graduação. Com o passar dos anos, a admiração e a afinidade só aumentaram e se estenderam tornando tu uma pessoa essencial na minha vida. Obrigada pela amizade incondicional e por estar sempre perto!

Aos meus amigos da sala quatro e do laboratório de Biologia Molecular que dividem o convívio diário comigo e enfrentam minhas oscilações de humor, são eles: Márcio, Dani (+ Joana), Lupe, Liane, Fred, Renatão, Rubens, Isabel, Cássia, Bruno Cruz, Bruno Oliveira, Camila Dalmolin, Cássia, Natália e Raiza. Obrigada pelo companheirismo, pelas conversas, cafés e momentos de descontração. A companhia de vocês torna o dia-a-dia mais leve!

Agradeço especialmente a Bruna por ter me acolhido no laboratório logo no início e as queridas Cecília e Juliana por todo carinho e amor que permitiram que nossa amizade crescesse ainda mais! Adoro vocês!

A todos meus colegas da Fisiologia que compartilharam momentos de estresse, seminários e provas, somados a experimentos e mais experimentos. Aos que tornaram a vida mais leve seja com piadas ou com tragédias engraçadas: Roberta Socoowski, Gisele Weber e Lidiane Dal Bosco. Ao pessoal da casa mais badalada do Cassino também: Alexandre Hartmann, Aline Sartório e Danusa Leidens.

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande – FURG pela oportunidade de realizar minha formação acadêmica em uma instituição pública de excelência;

Agradeço ao Programa de Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada e a seus professores que contribuíram imensamente para a minha formação. Obrigada pela paciência e dedicação;

As agências de fomento Capes e CNPq pelo apoio financeiro durante o mestrado.

E por fim agradeço aqui, mesmo que simbolicamente, a todos mistérios que ainda permanecem escondidos nessa imensidão de fenômenos biológicos; são eles que nos estimulam e impulsionam a dedicar nossas vidas para a ciência.

“The most beautiful experience we can have is the mysterious - the fundamental emotion which stands at the cradle of true art and true science.” *Albert Einstein*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO GERAL	8
1. INTRODUÇÃO GERAL	9
1.1 Sistema Imunológico: Visão Geral	9
1.1.1 Imunidade Natural.....	9
1.1.2 Imunidade Adquirida.....	10
1.1.2.1 Linfócitos	10
1.2 Desenvolvimento do Sistema Imune.....	14
1.2.1 Medula Óssea e Hematopoiese.....	14
1.2.2 Timo e Diferenciação dos linfócitos T.....	15
1.3 Funcionamento do Sistema Imune.....	16
1.3.1 Ativação dos linfócitos B e T.....	16
1.4 Zebrafish (<i>Danio rerio</i>): Modelo Experimental	19
1.5 Sistema Imunológico em Peixes Teleósteos	20
1.5.1 Hematopoiese e Desenvolvimento	20
1.6 Hormônio do Crescimento (GH) e seu Receptor (GHR)	21
1.6.1 Via de Sinalização do GH	22
1.6.2 Interações do GH sobre o Sistema Imunológico.....	22
1.7 Aquicultura e Geração de Organismos Transgênicos para o GH.....	24
1.7.1 Efeitos do GH sobre o Sistema Imune em Peixes Transgênicos	25
2. OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos Específicos	27
ARTIGO:	28
Effects of somatotrophic axis (GH/GHR) double transgenesis on structural and molecular aspects of zebrafish immune system	28
Highlights:.....	29
Abstract:	30
1.Introduction	31
2. Materials and Methods	33
2.1 Transgenic fish lineages, crossings and maintenance conditions.....	33
2.2 Histological and morphometric analysis.....	33
2.3 Immunohistochemical analysis.....	33
2.4 Analysis of gene expression.....	34
2.5 Statistical Analyses	34
3. Results	34
3.1 Histological and morphometric analysis.....	34
3.2 Analysis immunohistochemical	35
3.3 Gene expression analysis.....	35

4. Discussion	35
5. Annexes	40
Table 1. Gene-specific primers used for quantitative PCR expression analyses	40
Figure 1. Histological analysis	41
Figure 2. Thymus immunohistochemistry	42
Figure 3. Head kidney immunohistochemistry	43
Figure 4. Gene expression analysis.....	44
6. References	45
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	48
4. BIBLIOGRAFIA GERAL	49

RESUMO GERAL

O desenvolvimento de organismos transgênicos para o hormônio do crescimento (GH) tem sido considerado uma importante alternativa para o aumento nas taxas de crescimento animal. Entretanto, os efeitos do excesso do GH não se limitam aos processos do crescimento. Sistemas fisiológicos como o sistema imunológico, já demonstraram ser prejudicados pelo desbalanço dos níveis do GH. Tendo em vista a importância da geração de organismos transgênicos para o GH no âmbito da aquicultura, esforços se fazem necessários na elaboração de estratégias com o intuito de reduzir ou compensar os efeitos adicionais do excesso de GH. Nos hipotetizamos que a geração de peixes duplo transgênicos os quais superexpresssem GH e GHR apenas no músculo esquelético, poderia ser uma possível alternativa para compensar os efeitos prejudiciais ocasionados pelo excesso de GH sobre os sistemas fisiológicos mantendo, ao mesmo tempo, as altas taxas de crescimento. Afim de testar esta hipótese, nós avaliamos a morfometria de órgãos imunes, como o timo, o rim cefálico e o baço; os conteúdos de células T CD3⁺ e CD4⁺ no timo e no rim anterior e a expressão de genes relacionados à imunidade. Contrariando as expectativas iniciais, os resultados revelaram que a superexpressão do GHR no músculo esquelético não é capaz de diminuir os efeitos danosos causados pelo GH no tamanho do timo e rim anterior e no conteúdo de células T CD3⁺ e CD4⁺ nestes órgãos. Inesperadamente, zebrafish transgênicos somente para o GHR revelaram prejuízos nos aspectos imunes similares aos observados aos transgênicos para GH. De forma geral, estes resultados indicam que a dupla transgenia para o GH/GHR não é capaz de atenuar os efeitos negativos causados pelo excess de GH sobre o sistema imunológico de zebrafish transgênicos. Além disso, a transgenia para genes componentes do eixo somatotrófico pode ainda reforçar os danos as funções imunes em transgênicos, não recuperando os danos causados pelo excesso de GH.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Sistema Imunológico: Visão Geral

“Qualquer pessoa que tenha tido o privilégio de ouvir o desempenho de uma brilhante orquestra executando uma sinfonia [...] sabe que cada instrumento musical cuidadosamente afinado contribui para o som coletivamente harmonioso produzido pelos músicos. De certo modo, o sistema imunológico, trabalhando de forma harmoniosa, atua continuamente como uma orquestra sinfônica para manter a homeostasia no contexto das defesas do hospedeiro (Coico e Sunshine, 2010).”

A palavra “imunidade” é oriunda do termo em latim *immunis* no qual significa “isento”. Dessa forma, esse termo se refere aos mecanismos utilizados pelo corpo como proteção contra agentes ambientais que são estranhos, tornando o corpo isento a eles. Assim sendo, para garantir a imunidade, os seres vivos contam com um sistema complexo formado por órgãos, células e moléculas que se comunicam entre si e exercem ações coordenadas para defesa do organismo; tal sistema foi denominado como sistema imunológico. A sofisticada capacidade de reconhecimento que o sistema imunológico possui, o permite distinguir moléculas que são próprias do organismo daquelas que não são próprias e ainda permite o desencadeamento de respostas imunológicas. De maneira conceitual, o sistema imunológico de vertebrados é dividido em imunidade natural e imunidade adquirida. Entretanto, apesar de suas diferentes características, esses sistemas funcionam de maneira integrada nos mecanismos de resposta imunológica contra patógenos (Sunshine and Coico, 2010).

1.1.1 Imunidade Natural

A imunidade natural ou inata representa a primeira barreira de defesa frente à presença de patógenos, conferindo ao organismo um padrão de resposta não específico contra invasores externos. Apesar disso, muitas infecções são controladas por este aparato sem a necessidade de recorrer ao sistema imune adaptativo (Levraud and Boudinot, 2009). Esse padrão de imunidade é composto por barreiras físicas e químicas inespecíficas, e também por componentes celulares. Dentre as barreiras físicas que compõem esse sistema estão a pele e as membranas mucosas; e compõem as barreiras químicas fatores como o pH, ácidos graxos e proteínas séricas como a enzima lisozima. Esses componentes participam da primeira linha de defesa do organismo. Entretanto, caso patógenos ultrapassem estas defesas externas ao corpo, a imunidade inata ainda conta com componentes

celulares capazes de desencadear respostas para combater o patógeno. As células fagocíticas como os granulócitos e os macrófagos, as células dendríticas e as células *natural killer*, são ativadas após entrarem em contato com microorganismos, podendo liberar potentes antimicrobianos e citocinas. Essas células também estão envolvidas em etapas importantes no desencadeamento de respostas imunológicas adquiridas que são mediadas por linfócitos B e T, assim como em processos inflamatórios. Um exemplo desse envolvimento é o processo de apresentação de antígeno as células T da imunidade adquirida. Células apresentadoras de antígenos (APCs) da imunidade natural apresentam epítomos antigênicos para às células T, o que possibilita que essas desenvolvam e apresentem respostas antígeno-específicas. Os epítomos antigênicos são apresentados para às células T ligados ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC), um complexo protéico expresso na superfície celular das APCs (Sunshine and Coico, 2010).

1.1.2 Imunidade Adquirida

Diferentemente da imunidade inata, a imunidade adquirida apresenta padrões de resposta específicos diante a determinado antígeno. Evolutivamente, esse tipo especializado de defesa surgiu somente a partir dos vertebrados sendo que invertebrados são providos somente de respostas imunes inatas (Du Pasquier, 2001). Os linfócitos T e B são as principais células componentes desse sistema e conferem a capacidade de memória ao sistema imune, impedindo assim uma reinfecção com o mesmo microorganismo. Respostas imunológicas derivadas desse sistema, frequentemente, necessitam mais tempo para se desenvolver tendo em vista que, mediante ao microorganismo, os poucos linfócitos T e B específicos para determinado antígeno precisam sofrer expansão clonal para que possam ajudar a combater a infecção. Nos mamíferos a medula óssea, o timo, o baço e os linfonodos são os principais órgãos envolvidos na maturação, na diferenciação, na proliferação e nas respostas desencadeadas pelos linfócitos (Sunshine and Coico, 2010).

1.1.2.1 Linfócitos

Os linfócitos B e T, participam das respostas imunes adaptativas em vertebrados. Apesar desses linfócitos apresentarem peculiaridades em relação ao local de maturação (células T maturam no ambiente tímico), acredita-se que os linfócitos derivem de células progenitoras comuns de linfócitos, *common lymphoid progenitors* (CLP), durante a hematopoiese (Kondo et al., 1997). Ambos, linfócitos B

e T, expressam receptores específicos em suas membranas celulares. Os linfócitos B expressam imunoglobulinas, que podem inclusive ser secretadas e atuar como fatores humorais, enquanto os linfócitos T expressam um complexo conhecido como receptor de célula T (TCR). Toda a capacidade de reconhecimento e especialização que os linfócitos possuem se deve ao fato de que estas células são capazes de expressar receptores antígeno-específicos de sequência única, ou seja, cada linfócito é capaz de expressar um receptor único para o reconhecimento de um tipo antigênico. Essa característica possibilitou um imenso repertório de antígenos capazes de ser reconhecidos por essas células. Estima-se que o número de células B e T, com diferentes especificidades antigênicas que podem ser geradas em um único indivíduo, varie de 10^{15} a 10^{18} , o que significa que um indivíduo possa gerar de 10^{15} a 10^{18} diferentes moléculas de Ig ou TCR. Essas especificações apenas se tornaram possíveis devido a um sistema coordenado de rearranjo gênico, no qual participam proteínas como *recombination activating gene -1* (RAG-1) e RAG-2. Esses processos de recombinação serão discutidos em mais detalhe no tópico sobre os processos relacionados aos linfócitos T.

Linfócitos T

Em mamíferos, precursores de linfócitos T são originados a partir de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) na medula óssea. Tardiamente, estes progenitores são endereçados para o timo onde sofrem processos de maturação e diferenciação, antes de serem liberados para a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea essas células migram para órgãos imunes periféricos como o baço e linfonodos, para completar sua diferenciação (Boehm and Bleul, 2006). Esses linfócitos apresentam uma especificidade restrita para antígenos. Eles são capazes de reconhecer peptídeos antigênicos ligados a proteínas do hospedeiro pertencentes ao complexo principal de histocompatibilidade (MHC) que se expressam nas superfícies das células apresentadoras de antígenos (APC) (Maisey and Imarai, 2011). Dessa forma os linfócitos T reconhecem e respondem a antígenos ligados a superfície celular e não a antígenos solúveis.

Complexo TCR

A resposta contra antígenos desencadeada pelos linfócitos T acontece por intermédio da expressão do complexo TCR na membrana destes linfócitos. Este complexo é composto pelo receptor antígeno-específico das células T (TCR), juntamente com moléculas co-receptoras transmembrânicas. O TCR é formado por duas cadeias polipeptídicas, α e β ligadas por pontes de dissulfeto. Cada uma dessas cadeias apresenta domínios extracelulares similares aos encontrados nas moléculas de imunoglobulinas, com regiões constantes (C) e variáveis (V), que se dobram e são estabilizados por pontes de dissulfeto. As cadeias α e β são glicoproteínas transmembrânicas que possuem ainda uma região amino-terminal variável e uma região terminal com grupos carboxilas constante (Saito et al., 1984). Associado ao TCR ainda estão duas moléculas importantes envolvidas na transdução de sinal: o receptor CD3 e o receptor ζ (zeta) também conhecido como CD247. CD3 está sempre associado ao TCR e é invariante em todo repertório de células T, sendo formado por três peptídeos de pesos moleculares distintos γ , δ , e ϵ . Por sua vez, CD247 é formado por duas cadeias ζ idênticas. Esses dois receptores, CD3 e CD247, não participam na ligação com o antígeno. Entretanto, essas moléculas participam em importantes etapas nas fases iniciais de ativação das células T. Os receptores TCR, CD3 e CD247 formam o que chamamos de complexo TCR (Fig.1).

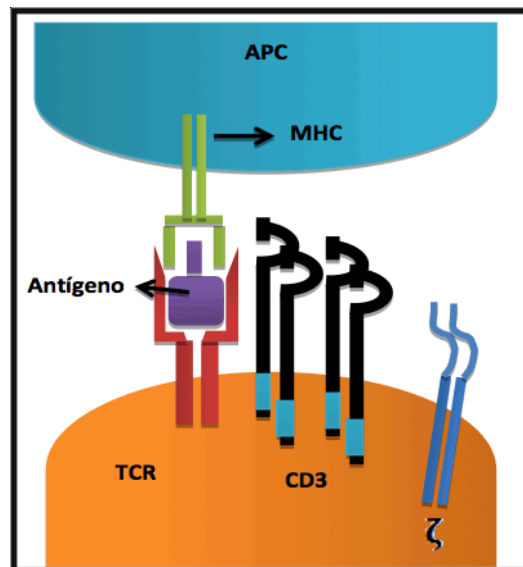


Fig. 1 Esquema da apresentação antigênica realizada pelas células apresentadoras de antígenos (APC) às células T. Em detalhe, as principais moléculas expressas na membrana celular da célula T (Batista, CR ., 2012. Trabalho de Conclusão de Curso).

Ainda, na superfície dos linfócitos T maduros são expressas moléculas correceptoras que não se ligam ao antígeno, mas aumentam a capacidade de ativação das células T diante os antígenos. Esses correceptores podem ser CD4 ou CD8, dividindo assim a população de células T em dois subtipos principais: linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺. Essas moléculas são capazes de se ligar, seletivamente, a porções extracelulares invariáveis das moléculas do MHC do hospedeiro, sendo que CD4 tem a capacidade de se ligar ao MHC classe II enquanto CD8 tem a afinidade pelo MHC classe I. Essa ligação ajuda a fortalecer a interação entre as células T e APC. Sendo assim, CD4 e CD8 funcionam como moléculas de adesão. Essa ligação induz a transdução de sinal intracelular devido a porção interna desses receptores estar ligada a enzimas quinases. O CD4 é expresso como um monômero na superfície das células T, enquanto que o CD8 é expresso como um heterodímero constituído de duas cadeias CD8 α e CD8 β . Os linfócitos CD4⁺ estão principalmente envolvidos na defesa do organismo contra agentes extracelulares que foram ingeridos pelos macrófagos bem como na produção de citocinas, enquanto os linfócitos CD8⁺ estão mais relacionados ao combate de infecções em que o microrganismo encontra-se no meio intracelular (Bevan, 2004; Zhu and Paul, 2008).

Rearranjo genético: Recombinação V(D)J

A enorme diversidade de receptores antigênicos encontrada nas células B e T somente tornou-se possível devido ao processo enzimático conhecido como recombinação V(D)J. Esse processo medeia o rearranjo dos genes codificantes para subunidades dos receptores de células B e T através da expressão de dois genes conhecidos por ativarem os processos de recombinação, RAG-1 e RAG-2. A expressão desses genes acontece nas células precursoras dos linfócitos e é um evento decisivo para os processos de maturação e diferenciação. O processo de recombinação V(D)J, ocorre através do rearranjo de vários genes da região variável(V) com genes de diversidade (D) e/ou junção (J) em cada linfócito, gerando um novo éxon rearranjado para cada gene do receptor de antígenos (TCR). A recombinação envolve a aproximação dos genes apropriados localizados a grandes distâncias no cromossomo. Seguidamente, são realizadas quebras na dupla hélice nas extremidades desses segmentos gênicos e essas extremidades processadas são ligadas para produzir genes de receptores de antígenos clonalmente únicos, mas diversos, que podem ser eficazmente transcritos. Nesse processo, RAG-1 e RAG-2 formam um complexo também conhecido como recombinase V(D)J (Sunshine and

Coico, 2010). RAG -1 representa a subunidade catalítica do complexo RAG-1/RAG-2, enquanto RAG-2 atua como subunidade reguladora, que é essencial para todas as atividades (Fugmann, 2010).

1.2 Desenvolvimento do Sistema Imune

1.2.1 Medula Óssea e Hematopoiese

Em mamíferos, células-tronco hematopoiéticas (HSCs) surgem durante o desenvolvimento embrionário e se concentram, primeiramente, na região da aorta gonadal mesonéfrica, seguido após para o fígado fetal, baço e finalmente à medula óssea. Durante a vida adulta, a medula óssea representa o principal sítio hematopoiético. Entretanto, pulmões, fígado e baço podem também realizar os processos de hematopoiese (Mercier et al., 2012). As células originadas deste processo podem ser divididas, de maneira geral, em quatro tipos principais: as eritróides, as mielóides e os linfócitos B e T, sendo que todas estas células são originadas no fígado fetal durante o desenvolvimento ou na medula óssea, exceto os linfócitos T, que se originam através de processos de maturação no timo (Kawamoto et al., 2010). Entretanto, ainda não há um consenso em relação a um único modelo que explique as decisões celulares que permitem que HSCs culminem em cada uma das linhagens originadas no processo hematopoiético. Um dos modelos atualmente propostos sugere diferentes ramos para diferenciação, agrupando megacariócitos, eritrócitos e células mielóides, separadamente da origem das células *natural killer*, dos linfócitos B e T. Esse modelo propõe que, em um primeiro momento, HSCs podem se diferenciar em três tipos diferentes de células precursoras conhecidas: *lymphoid-multipotent primed progenitor* (LMPP); *early lymphoid progenitor* (ELP) ou *multipotent progenitor* (MPP). Seguidamente, em uma segunda etapa da diferenciação, surgem as células conhecidas como progenitores comuns mielóides (CMP), que originarão os megacariócitos, os eritrócitos e as células mielóides; por outro lado, através do surgimento dos progenitores comuns linfóides (CLP), se originarão as células *natural killer* e os linfócitos B e T (Ceredig et al., 2009) (Fig. 2). Possibilitando que estes complexos e regulados processos hematopoiéticos aconteçam, a medula óssea providencia nichos que suportam a função das HSCs e das células imunes. Estes nichos celulares são compartimentos funcionais, nos quais os tecidos componentes regulam a renovação celular, diferenciação e quiescência através de contato direto com as células, assim como utilizando-se de fatores de crescimento, citocinas e componentes da matrix extracelular (Mercier et al., 2012).

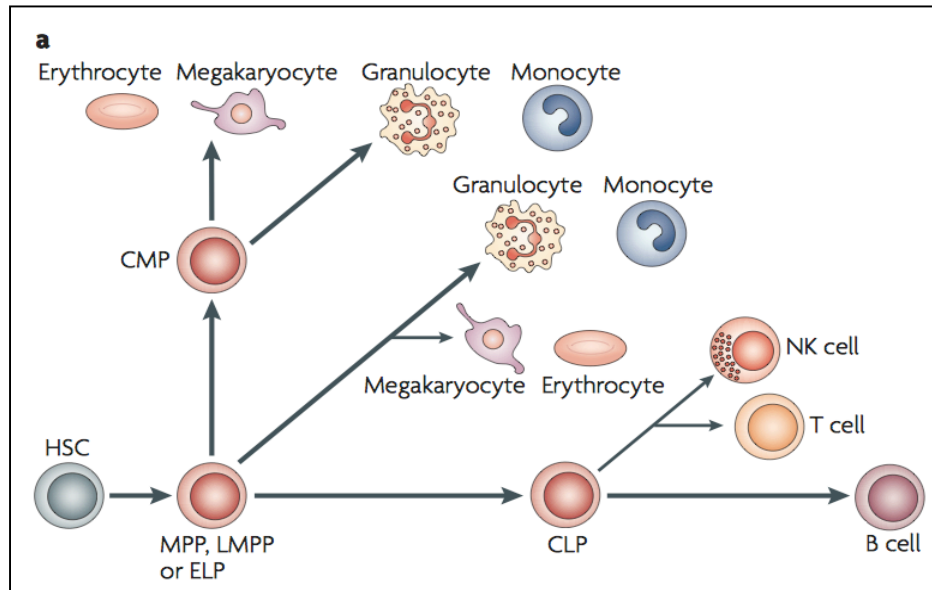


Fig. 2 Ilustração dos processos hematopoiéticos e desenvolvimento das células imunes (Ceredig et al., 2009).

1. 2. 2 Timo e Diferenciação dos linfócitos T

O timo representa o órgão responsável pela diferenciação e seleção das células T. O processo de diferenciação abrangem várias etapas, desde a entrada dos progenitores linfóides no timo, sua diferenciação e exportação para a corrente sanguínea. A primeira etapa neste processo é marcada pela capacidade das células progenitoras dos linfócitos T (LMPP e CLP) derivadas de HSCs migrarem para o interior do timo. A migração desses progenitores só se torna possível pela presença de receptores de quimiocinas expressados pelas LMPPs e CLPs. Dentre os receptores expressos por essas células já foram caracterizados *CC-chemiokine receptor-7 (CCR7)*, *CC-chemiokine receptor-9 (CCR9)*, *P-selectin glycoprotein ligant 1 (PS6L1)* e *CXC- chemokine receptor 4 (CXCR4)*. Dessa forma, LMPP e CLP são atraídos para o interior do timo através do gradiente de quimiocinas específicas para esses receptores, produzidas por células tímicas endoteliais. Os progenitores LMPPs e CLPs que entraram no timo são chamados de *thymus-settling progenitors (TSPs)* que logo se diferenciam em *early T cell progenitors (ETPs)*, também conhecidos por timócitos DN1. Os timócitos DN1 são duplo negativos, não expressando neste estágio os co-receptores de linfócitos CD4 e CD8. Esses timócitos movem-se então para dentro do córtex tímico e se diferenciam em timócitos DN2 e DN3 na zona subcapsular. Esses primeiros estágios de diferenciação intratímico, de DN1 a DN3, são definidos principalmente pela expressão de diferenciados marcadores celulares. A transição entre o estágio DN3 para o DN4

acontece também no córtex e é dependente da expressão e sinalização do pré-TCR e do receptor CXCR4, que induzem a proliferação e a diferenciação para esse estágio. Finalmente, timócitos DN4 começam a expressar os co-receptores CD4 e CD8 transitando assim para o estágio DP, ou duplo positivo ($CD4^+ CD8^+$). Ainda nesse estágio, DP timócitos interagem com auto-peptídeos ligados a complexos MHC nas células tímicas epiteliais, processo que é conhecido como seleção positiva. Após esse processo, células DP que geram sinais de baixa intensidade em resposta a ligação com auto-peptídeos, migram para a medula e se diferenciam em *single positive cells* (SPs): células $CD4^- CD8^+$ ou $CD4^+ CD8^-$, que, por sua vez saem do timo colonizando os órgão imunes periféricos (Love and Bhandoola, 2011) (Fig. 3).

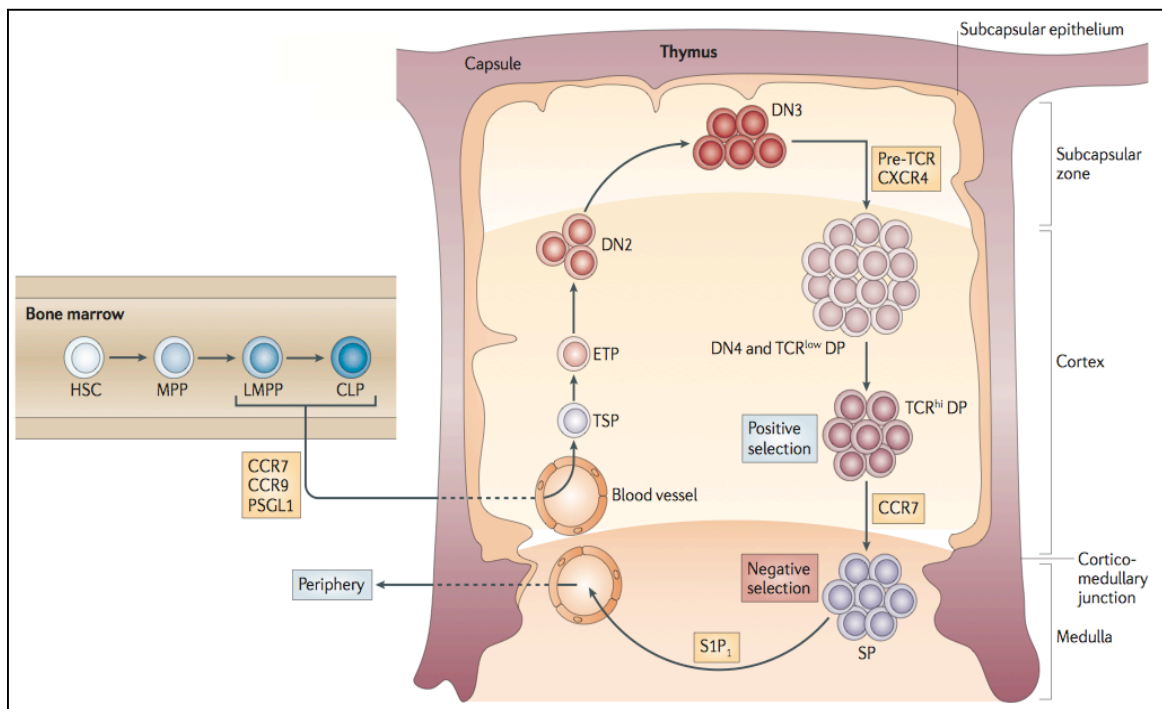


Fig. 3 Ilustração dos processos de maturação dos linfócitos T no ambiente tímico (Extraído: Love and Bhandoola, 2011).

1.3 Funcionamento do Sistema Imune

1.3.1 Ativação dos linfócitos B e T

O processo de ativação dos linfócitos acontece quando estas células interagem com antígenos específicos aos seus receptores celulares. Mediante a interação com o antígeno, os linfócitos B e T são ativados, proliferando-se e diferenciando-se em células efetoras e células de memória. Entretanto, os

linfócitos B em resposta a ativação antigênica, produzem e liberam anticorpos de diferentes isotipos; enquanto que os linfócitos T podem responder através da liberação de citocinas ou da atividade citotóxica. Apesar das funções e respostas dos linfócitos B e T serem distintas, esses tipos celulares funcionam coordenadamente nas respostas específicas mediadas pela imunidade (Sunshine and Coico, 2010).

Ativação dos Linfócitos T

Como mencionado anteriormente, os linfócitos T são ativados através da interação de seu receptor com os antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), as quais são capazes de processar o antígeno e apresentar peptídeos catabolizados aos linfócitos T. Em relação às respostas geradas mediante a ativação, os linfócitos T são divididos em duas subpopulações principais: os linfócitos CD4⁺, que secretam um conjunto de citocinas capaz de afetar as respostas de vários tipos celulares; e os linfócitos CD8⁺, os quais são efetores citotóxicos para as células infectadas do hospedeiro. Os eventos intracelulares que ocorrem mediante a interação do TCR com o MHC das APCs são similares entre os linfócitos CD4⁺ e CD8⁺. O reconhecimento de antígenos na superfície celular desencadeia múltiplas cascatas intracelulares que se estendem da superfície celular até o núcleo. Especificamente, a ligação do MHC-peptídeo nas regiões do TCR transmite um sinal via moléculas CD3 e ζ para o interior das células. No interior das células, associadas às regiões citoplasmáticas de CD3 e ζ , estão enzimas tirosinas quinases *Fyn*, e que são ativadas após a ligação antígeno-TCR. Ainda, nos linfócitos CD4⁺, a enzima tirosina quinase *Lck*, que é associada com as regiões citoplasmáticas de CD4 também é ativada. Assim que ativadas essas enzimas fosforilam regiões específicas dos receptores CD3 e ζ , que servirão de sítios de ancoramento outra enzima tirosina quinase conhecida como ZAP-70, a qual é ativada pela enzima *Lck*. Uma vez ativada, ZAP-70 fosforila inúmeras proteínas dentre as quais, moléculas adaptadoras, que não possuem atividade enzimática mas apresentam múltiplos domínios para ligação de outras proteínas. Essas moléculas adaptadoras são recrutadas para a membrana celular formando um complexo maior de moléculas de transdução de sinal junto à sinapse imunológica. Em resumo do processo, estas moléculas adaptadoras ativam a enzima fosfolipase-C, resultando na ativação da proteína quinase C, que por sua vez fosforila e ativa o fator de transcrição NF- κ B, localizado no citoplasma. No núcleo, NF- κ B e outros fatores de transcrição, regulam genes importantes nesse processo de ativação. Dentre os genes ativados por esta sinalização estão a citocina IL-2 e do receptor

IL-2R α . A IL-2 é um fator de crescimento e proliferação das células T, podendo atuar nas células que sintetizaram e secretaram esta molécula e também sobre as células T adjacentes, dessa forma, tendo um importante papel no processo de ativação dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ (Sunshine and Coico, 2010).

Função dos Linfócitos CD4⁺

Os linfócitos CD4⁺ podem ser divididos em subpopulações dependendo dos tipos de citocinas que sintetizam e secretam, podendo ser classificados em quatro subpopulações: Th1, Th2, Th17 e T_{REG}. Estas subpopulações diferenciam-se dependendo do tipo de citocinas presente durante a ativação das células CD4⁺ *naives*. Geralmente, essas citocinas são liberadas por células componentes da imunidade natural. Sabe-se, A atividade efetora de cada população CD4⁺ é determinada pelo tipo de citocina que secretam, as quais terão efeitos sobre determinados tipos celulares. Linfócitos Th1 secretam IFN- γ e IL-2 as quais tem ação sobre os macrófagos, as células NK, os linfócitos T CD8⁺ e os linfócitos B; possuindo como principal função efetora a presença de respostas mediante a infecção por vírus ou bactérias. Já a subpopulação Th2 caracteriza-se pela liberação de IL-4, IL-5 e IL-13, que exercem papéis sobre eosinófilos e em células B. Esse tipo celular está envolvido na resposta a vermes e substâncias alergênicas. Os linfócitos Th17 tem atividade pró-inflamatória, além de apresentarem respostas a fungos e bactérias extracelulares. As citocinas IL-17 e IL-22 são as características desse tipo celular, as quais agem principalmente sobre neutrófilos e células epiteliais. Atuando sobre a regulação dos outros linfócitos está a subpopulação T_{REG}, que é caracterizada pela liberação de TGF- β e IL-10. Esse grupo linfocitário é capaz de inibir a função de outros conjuntos de células T (Sunshine and Coico, 2010).

Função dos Linfócitos CD8⁺

A principal função deste grupo linfocitário é destruir as células do organismo que foram infectadas por vírus e/ou bactérias. A ativação destas células acontece de maneira similar com os mecanismos de ativação das células CD4⁺. Primeiramente, o peptídeo antigênico ligado ao MHC classe I nas células APC é reconhecido especificamente pelo complexo TCR do linfócito CD8⁺. Da mesma forma do que acontece com os linfócitos CD4⁺, essa interação induz a proliferação destas células e acredita-se que linfócitos CD8⁺ também sintetizem IL-2 quando ativadas. Os linfócitos CD8⁺ mediante a ativação utilizam-se de seus grânulos citoplasmáticos com função citotóxica. Após a ligação com a célula-alvo, os linfócitos CD8⁺ reorganizam sua estrutura interna de modo que estes grânulos fiquem próximos à

área de contato com a célula-alvo. Então, por um processo de exocitose, os grânulos são liberados sobre a membrana da célula-alvo. Estes grânulos, na maior parte, são formados por moléculas de perforinas e granzimas, sendo a primeira capaz de abrir poros nas células alvo aumentando a permeabilidade da membrana celular. Através destes poros as granzimas penetram nas células e interagem com os componentes intracelulares da célula para induzir a apoptose (Sunshine and Coico, 2010).

1.4 Zebrafish (*Danio rerio*): Modelo Experimental

Zebrafish (*Danio rerio*) é um peixe de água-doce pertencente à família Ciprinidae, distribuído naturalmente no sul e sudoeste da Ásia, nordeste da Índia, Bangladesh e Myanmar. No início do século 19, no ano de 1822, as espécies de *Danio* foram reportadas pela primeira vez por Francis Hamilton, no livro “*An Account of the Fishes Found in the River Ganges and its Branches*” (Spence et al., 2008). Zebrafish vem sendo considerado um excelente modelo para pesquisa em vertebrados, sendo utilizado em diversos estudos. Um dos maiores contribuidores para este atual cenário foi o pesquisador George Streisinger, que começou a utilizar esse organismo como modelo para pesquisa genética no final dos anos 1960’s. Algumas características da biologia desta espécie motivaram Streisinger a utilizá-la como modelo, dentre as principais: a facilidade de cultivo e reprodução em laboratório; o alto número de ovos gerados na progênie; a fertilização externa e os estágios do desenvolvimento embrionário serem translúcidos (Rosenthal and Ashburner, 2002). Posteriormente, estes mesmos atributos possibilitaram que o zebrafish se tornasse modelo para uma grande variedade de estudos do desenvolvimento e também fosse amplamente utilizado na pesquisa biomédica. No campo da imunologia, um vasto número de modelos de zebrafish mutantes já foram desenvolvidos para o acompanhamento dos processos hematopoiéticos e de desenvolvimento deste sistema. Ainda, zebrafish tem sido utilizado como modelo de estudo para doenças humanas como a leucemia por exemplo, e para o entendimento das respostas da imunidade mediante a infecções (Trede et al., 2004) (Fig. 4).

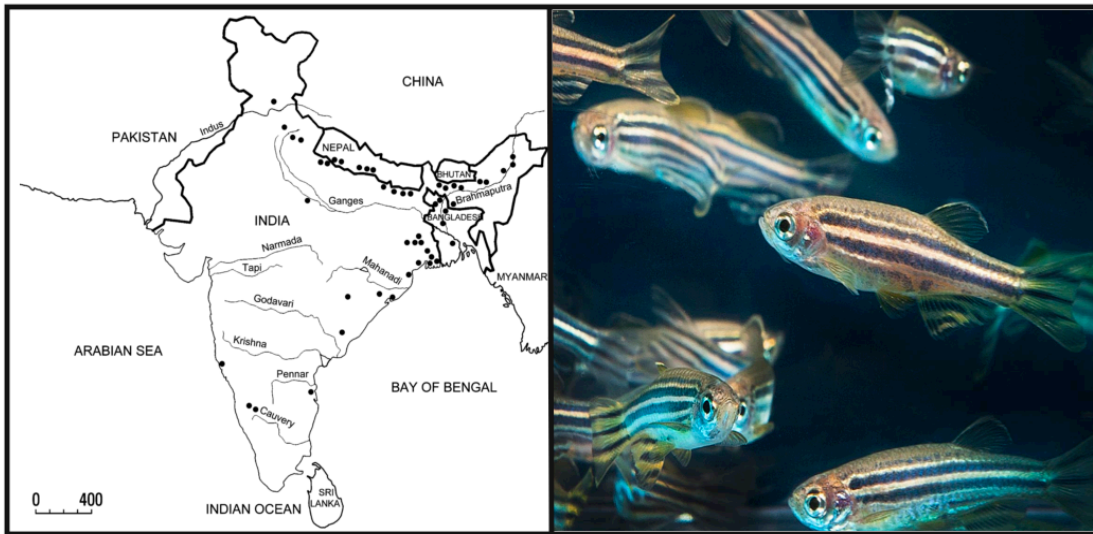


Fig. 4 Representação da espécie *Danio rerio* e sua distribuição geográfica.

1.5 Sistema Imunológico em Peixes Teleósteos

Apesar do sistema imune de peixes teleósteos possuir uma alta similaridade com o de mamíferos existem algumas diferenças importantes que diferem estes grupos. Peixes teleósteos, por exemplo não possuem medula óssea. Esse órgão executa as funções hematopoiéticas em mamíferos. Essas funções em teleósteos foram assumidas pela porção anterior do rim, que neste grupo tornou-se um importante órgão linfóide. Além disso, teleósteos não possuem gânglios linfáticos, estrutura com importante papel na resposta imune em mamíferos (Press and Evensen, 1999). No tópico a seguir abordaremos em maior detalhe os processos de desenvolvimento do sistema imunológico em teleósteos, tendo como modelo o zebrafish.

1.5.1 Hematopoiese e Desenvolvimento

Os processos da hematopoiese em zebrafish são fundamentalmente similares aos que acontecem em outros vertebrados. Inicialmente, progenitores comuns para as células sanguíneas e para as células do endotélio vascular são inicialmente localizados em duas regiões principais do embrião: no tronco e na região cefálica. Esses progenitores são derivados da mesoderme lateral do embrião. O desenvolvimento prossegue e, após ser iniciada a circulação sanguínea, por volta de 11 horas após a fertilização, as células progenitoras localizadas no tronco do embrião convergem para o meio, onde se agrupam formando uma massa celular conhecida como massa celular intermediária (ICM). A ICM intraembrionária é considerada o primeiro sítio hematopoiético durante a embriogênese. Estudos mostraram que células hematopoiéticas pluripotentes, como as encontradas na ICM, existem

em outros locais do embrião como na parede dorsal da aorta e também na região ventral da veia caudal. Dessa forma, estes locais podem ser também considerados como sítios hematopoiéticos definitivos em zebrafish, sendo a ICM o local onde ocorre uma diferenciação inicial dos eritrócitos. As células progenitoras localizadas na região cefálica do embrião dão origem aos primeiros macrófagos. No momento da eclosão dos ovos, o sistema imune ainda está em desenvolvimento e nem todas as estruturas e funções presentes em adultos existem no estágio larval. A organogênese dos órgãos linfóides ocorre no meio do período embrionário e envolve o desenvolvimento do timo e do rim cefálico primordial. Estes órgãos são colonizados por linfócitos primordiais relativamente cedo, porém estas células só se tornam imunocompetentes quando os componentes do estroma dos órgãos não linfóides amadurece, principalmente as células epiteliais, dendríticas e fibroblásticas. A maturação das células do estroma fornece um microambiente favorável para maturação das células linfóides, processo que envolve seleção, diferenciação e expansão das células imunocompetentes. A imunidade natural permanece não funcional nos primeiros estágios larvais, tornando-se plenamente competente após a maturação dos órgãos linfóides, processo que ocorre após várias semanas após a eclosão (Steiner et al., 2004).

1.6 Hormônio do Crescimento (GH) e seu Receptor (GHR)

O hormônio do crescimento (GH) é a principal molécula responsável pelo crescimento somático em vertebrados, estando também envolvido na regeneração e divisão celular. O GH ainda controla processos do metabolismo energético e exerce uma série de efeitos pleiotrópicos em outros sistemas fisiológicos como reprodução, comportamento, osmorregulação e sobre o sistema imunológico. A produção e liberação deste hormônio protéico ocorre na glândula hipófise anterior sob controle hipotalâmico. O hipotálamo, sob estímulos endógenos e também externos, libera o hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH) no qual estimula a liberação do GH. Na corrente sanguínea, o GH liberado executa suas ações através da ligação com seu receptor específico, o receptor do hormônio do crescimento (GHR). Devido a suas características estruturais, esse receptor transmembrânico GHR, é classificado como receptor de citocinas da classe I. Estes receptores estão distribuídos em vários tecidos, estando presentes principalmente no fígado e nos ossos (Moyes and Schulte, 2010).

1.6.1 Via de Sinalização do GH

Já é estabelecido que para a ativação da via de sinalização em resposta ao GH, somente uma molécula deste hormônio é necessária, ligando-se a duas moléculas de GHR localizadas na membrana plasmática. Essa ligação induz a formação de um homodímero entre as moléculas de GHR, etapa crucial para o desencadeamento dos eventos sequenciais da sinalização do GH. Em resposta à ligação GH-GHR, dentre as vias de sinalização que podem ser ativadas, está a via conhecida como JAK-STAT. Na porção interna do GHR, associadas a regiões ricas no aminoácido prolina, estão proteínas quinases pertencentes a família das Janus, conhecidas como JAK-2. Devido às mudanças conformacionais induzidas pela ligação do GH com seus receptores, as JAK-2 associadas ao GHR se aproximam e se autofosforilam. Ativadas, JAK-2 fosforilam regiões específicas do GHR ricas em resíduos de tirosina, que servirão como sítios de ancoragem para outras proteínas. Dentre as proteínas recrutadas pela ativação das JAKs estão as proteínas STATs (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), as quais se ancoram aos resíduos fosforilados de tirosina do GHR. Fosforiladas pelas JAKs, proteínas STATs, formam homo ou heterodímeros que translocam-se para o núcleo regulando a transcrição de diversos genes. Especificamente, as proteínas STAT1, STAT3 e STAT5 estão relacionadas à via de sinalização do GH e sabe-se que a ativação destas moléculas pelo GH está relacionada a processos celulares como a apoptose, a diferenciação e a proliferação celular (Herrington and Carter-Su, 2001; Zhu et al., 2001). Ainda, em resposta a ativação da via JAK/STAT, proteínas conhecidas como supressoras da sinalização de citocinas (SOCS) são transcritas funcionando como reguladores negativos desta via. SOCS podem reprimir a via de sinalização do GH por competirem com as proteínas STATs, ou inibindo a ação das JAKs ou por ubiquitinação de componentes da via, seguido do processo de degradação proteossomal. As principais SOCS reportadas como induzíveis pelo GH são SOCS1, SOCS2, SOCS3 e CIS (Greenhalgh and Alexander, 2004).

1.6.2 Interações do GH sobre o Sistema Imunológico

Estudos em mamíferos, já mostraram a íntima relação do GH e de seu intermediário IGF (*Insulin-like Growth Factor*) com o sistema imunológico (Dorshkind and Horseman, 2000; Mazzocchi et al., 2010). Em peixes teleósteos estudos buscam entender os mecanismos de modulação do sistema imunológico através da ação de hormônios hipofisários, entre eles o GH. O primeiro estudo que

reportou a influência de hormônios hipofisários sobre o sistema imunológico de peixes foi publicado em 1951 por P. Rasquin no *Journal of Experimental Zoology* (Rasquin, 1951). Neste estudo, foi administrado em *Astyanax mexicanus* um extrato pituitário de carpa, o que resultou em um acréscimo no número de leucócitos na região cefálica do rim e no baço. Ainda corroborando com esse resultado, foi observado que a hipofisectomia leva a um decréscimo na função imunológica em muitas espécies de teleósteos, sugerindo a importância dos hormônios hipofisários na regulação do sistema imune destes vertebrados (Yada and Azuma, 2002). Dentro desse contexto, pesquisas demonstraram que o GH está envolvido na promoção de funções imunes como a fagocitose, atividade da lisozima, produção de anticorpos e proliferação linfocitária em peixes teleósteos (Yada, 2007). Recentemente, foram evidenciados os efeitos estimulatórios de IGF I sobre o sistema imune inato em truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, *in vivo* e *in vitro*. Em cultura celular de células fagocíticas houve um aumento da produção de superóxido e de lisozima no plasma destes animais (Yada, 2009). Esses resultados demonstram que tanto o GH quanto IGF estão envolvidos em funções imunológicas em peixes teleósteos. Além disso, outros estudos demonstraram que também o GHRH está envolvido tanto em funções de crescimento quanto afetando a produção de citocinas pró-inflamatórias (Nam *et al.*, 2011). Corroborando com estes estudos, receptores para GH foram caracterizados na região cefálica do rim de *Sparus aurata* e há evidências de mecanismos do GH no crescimento hematopoiético e como fator de diferenciação (Calduch-Giner *et al.*, 1997). Ainda, foi visto que receptores para GH e IGF são expressos em vários órgãos, incluindo a região cefálica renal em *Oncorhynchus mykiss* (Yada, 2009). Estes resultados apontam, pela presença desses receptores, para a possibilidade de um mecanismo de ação do GH e do IGF sobre essas estruturas. Ainda, GH e GHR mostram similaridades estruturais com moléculas citocinas do sistema imunológico (Ouyang and He, 2003). Tanto GH, quanto alguns tipos de interleucinas, ao se ligarem com seus respectivos receptores, ativam a enzima JAK ativando a via JAK/STAT, culminando em alterações nos níveis de transcrição gênica (Gorissen, *et al.*, 2011). De fato, todas essas interações evidenciam a íntima relação existente entre o sistema imunológico e os componentes do eixo somatotrófico.

1.7 Aquicultura e Geração de Organismos Transgênicos para o GH

Os estoques mundiais de pescado para alimentação provenientes da aquicultura tem ultrapassado o crescimento populacional nas últimas cinco décadas. Entretanto, estimativas preveem que no ano de 2021 o consumo *per capita* destes alimentos irão aumentar mundialmente comparado com as taxas de consumo atuais. Mediante a uma finita quantidade de recursos naturais, produtos derivados da aquicultura precisam continuar contribuindo com as demandas populacionais (*Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets.*, 2012). Para assistir esse cenário, a biotecnologia aplicada à aquicultura tem sido utilizada para gerar organismos geneticamente modificados. Especificamente, a produção de peixes transgênicos que superexpressam GH é considerada uma alternativa interessante para obtenção de um rápido crescimento animal em um menor tempo de cultivo (Ayoola and Idowu, 2008). Devido a isso, muitas espécies de peixes já foram geneticamente modificadas para a superexpressão deste hormônio, entre as quais, salmão do Atlântico (Du et al., 1992), carpa (Chen et al., 1993), *catfish* (Dunham et al., 1992) e tilápia (Rahman, 2001). Entretanto, mesmo que a transgenia para o GH mostre-se uma alternativa viável para a promoção de altas taxas de crescimento, ainda necessita de mais estudos a fim de averiguar quais são os possíveis efeitos adicionais ocasionados por esta tecnologia. Nesse sentido, tendo o intuito de estudar os efeitos fisiológicos em consequência da transgenia do hormônio em questão, nosso grupo desenvolveu um modelo de zebrafish (*Danio rerio*) transgênico que superexpressa o GH constitutivamente (Figueiredo et al., 2007) (Fig. 5). Nesta linhagem, alguns sistemas fisiológicos já foram investigados a fim de entender o relacionamento dos altos níveis de GH com o funcionamento destes sistemas. Dentre os parâmetros já avaliados sob a influência do GH estão: a osmorregulação (Almeida et al., 2013b), as respostas à hipóxia (Almeida et al., 2013a), o metabolismo energético e a produção de espécies reativas de oxigênio (Rosa et al., 2008), o envelhecimento e defesas antioxidantes (Rosa et al., 2010), a reprodução (Figueiredo et al., 2013), o funcionamento e regulação do eixo somatotrópico (Figueiredo et al., 2007; Studzinski et al., 2009). Além disso, estudos visando entender as relações do GH com o comportamento e memória e com os ritmos biológicos estão sendo desenvolvidos. Devido à relação do GH com os processos imunes em mamíferos, descrita amplamente na bibliografia, o uso de um modelo de peixe transgênico que produza GH em níveis supra fisiológicos propiciou uma ferramenta para um melhor entendimento

sobre os efeitos deste hormônio nos processos imunes em peixes. Nesse sentido o sistema imune neste modelo experimental foi avaliado recentemente por nosso grupo (Batista et al., 2014).

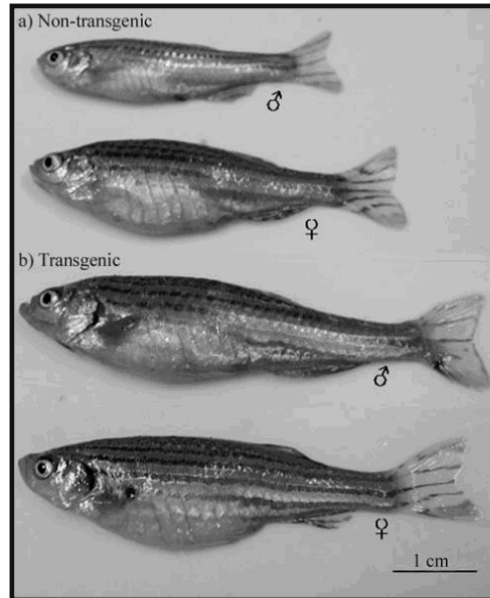


Fig. 5 Ilustração dos zebrafish não transgênicos (a) e transgênicos para o GH (b) (Extraído: Figueiredo et al., 2007).

Tendo em vista a importância da geração de organismos transgênicos para o GH no âmbito da aquicultura, esforços se fazem necessários na elaboração de estratégias com o intuito de reduzir ou compensar os efeitos adicionais do GH. Para este fim, nosso grupo desenvolveu uma segunda linhagem de peixe-zebra transgênico (Figueiredo et al., 2012). Esta linhagem superexpressa o receptor do hormônio do crescimento (GHR) somente no músculo esquelético, sob o controle transcricional do gene *mylz2*, objetivando melhorar a captura do GH neste tecido afim de aumentar as taxas de crescimento. Através do cruzamento desta linhagem com a linhagem de peixes transgênicos para o GH é possível produzir peixes transgênicos duplos, os quais expressam GH e, simultaneamente, GHR. Estes três modelos experimentais foram utilizados neste trabalho.

1.7.1 Efeitos do GH sobre o Sistema Imune em Peixes Transgênicos

Atualmente, alguns estudos já foram publicados visando avaliar as influências do excesso do GH sobre o sistema e as funções imunes em peixes transgênicos para o GH. A resistência a doenças, as

respostas ao estresse e os efeitos da triploidia, foram parâmetros avaliados no salmão *Oncorhynchus kisutch* transgênico para o GH (Jhingan et al., 2003). Nesse estudo, foi evidenciado que esse fenótipo pode afetar a resistência a doenças, podendo elevar ou diminuir a resistência dependendo do estágio de desenvolvimento analisado. No estágio juvenil, foram observadas baixas taxas de aparecimento da doença mediante ao desafio com *Vibrio anguillarum*. Ainda, em carpas *Cyprinus carpio* L. transgênicas para o GH, onde as defesas do sistema imunológico inato foram estudadas, a atividade da lisozima do soro foi aumentada em animais transgênicos em relação aos não transgênicos, além de também ocorrer um aumento do número de leucócitos nestes animais (Wang et al., 2006). Recentemente, um estudo investigando salmão do Atlântico transgênico para o GH revelou que estes animais tem mais dificuldade de manter a homeostasia após um desafio estressor (Cnaani et al., 2013). Mediante a estes resultados controversos, nosso grupo avaliou o sistema imune sobre a influência da transgenia para o GH no zebrafish (*Danio rerio*). No estudo em questão, foram verificados sérios comprometimentos das funções imunológicas nos transgênicos: quando desafiados com o agente estressor dexametasona, os transgênicos apresentaram maior mortalidade do que os não transgênicos. Os órgãos imunes avaliados apresentaram uma redução significativa de tamanho nos transgênicos, bem como houve uma redução no número de linfócitos CD3⁺ e CD4⁺. Corroborando com esses prejuízos, genes envolvidos no desenvolvimento da imunidade e em parâmetros da imunidade natural e adquirida mostraram uma expressão reduzida nos peixes transgênicos para o GH quando comparados ao controle (Batista et al., 2014). De forma geral, estes resultados divergentes reportados na bibliografia podem ser considerados efeitos espécie-específicos do excesso do GH sobre o sistema imune. Entretanto, esses resultados devem ser considerados como importantes fatores individuais das espécies mediante as práticas da aquicultura.

2. OBJETIVO GERAL

Este estudo visa verificar a influência isolada da superexpressão do hormônio do crescimento (GH), de seu receptor (GHR), bem como a ação simultânea da superexpressão desses genes sobre parâmetros do imunológico de zebrafish (*Danio rerio*) utilizando animais transgênicos como ferramenta.

2.1 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a influência da superexpressão do GH, do GHR e de ambos simultaneamente sobre o tamanho do timo, do rim cefálico e do baço;
- ✓ Verificar os efeitos causados pela superexpressão do GH, do GHR e de ambos simultaneamente sobre o conteúdo linfocitário CD3⁺ e CD4⁺ do timo e do rim anterior;
- ✓ Analisar os níveis de expressão de genes envolvidos no desenvolvimento linfocitário: RAG-1 e *ikaros zinc finger 1 (ikzf1)*; receptores de membrana de linfócitos T: *cd4-2 protein (cd4-2)* e *cd247 antigen (cd247)* e codificantes para citocinas: *interleukin 1, beta (il1b)* e *interferon phi 1 (ifnphi1)*, sobre a influência isolada e simultânea da superexpressão do GH e GHR.

ARTIGO:

Effects of somatotrophic axis (GH/GHR) double transgenesis on structural and molecular aspects of zebrafish immune system

Carolina Reyes Batista^{a, c}; Márcio Azevedo Figueiredo^{b, c}; Luis Alberto Romano^{b, d};
Luis Fernando Marins^{a, b, c}

This manuscript will be submitted a Molecular Immunology (Impact Factor: 2.645)

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Avenida Itália, Km 8, CEP 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Avenida Itália, Km 8, CEP 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Avenida Itália, Km 8, CEP 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil

^d Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande-FURG, Avenida Itália, Km 8, CEP 96201-900 Rio Grande, RS, Brazil

Highlights:

- ✓ GHR overexpression in the skeletal muscle does not attenuate the decreased in the area of thymus, head kidney and spleen caused by GH overexpression in transgenic zebrafish;
- ✓ GH excess impairs the quantity of CD3⁺ and CD4⁺ cells in the thymus and head kidney and simultaneous GHR overexpression was not able to revert these impairments;
- ✓ The *rag1* gene, involved in lymphocyte development, was down regulated in transgenics overexpressing GHR and GH/GHR in comparison to NT, being the important indicator to the injuries in the development processes.
- ✓ GHR transgenic group showed damage in the immune functions similar to observed in the GH and GH/GHR transgenics.

Abstract:

Biotechnology applied to aquaculture to develop transgenic fish for growth hormone (GH) has been shown a promising method to improve the growth rates. However, the role of GH is non-restricted only for the growth processes. Several others physiological systems, as well immune system, showed to be impaired due a GH unbalances. Assumed the importance to generate GH transgenic organisms for aquaculture proposes, it is necessary enforces in strategies to reduce or compensate the collateral effects of GH. We hypothesized that the generation of double transgenic fish, in which overexpresses GH and GHR only in the skeletal muscle, could be a possible alternative to compensate the GH impairs effects on the immune system, and also increase the fish growth rate. To test this hypothesis, were avaliated the immune-organs size; the T cells contents in the thymus and head kidney and the expression of immune-related genes in double transgenic fish. Contrary to our expectations, we have found that the overexpression of GHR does not decrease the damage caused by GH excess in the size of thymus and head kidney, and in the content of CD3⁺ and CD4⁺ cells in the thymus and head kidney. Unexpectedly, the control GHR transgenic group has been shown similar impairs on the immune system parameters. These results indicate that GHR overexpression does not recovery the impairments caused by GH and, in addition could reinforces the damaging in the immune functions in zebrafish transgenics.

Keywords: growth hormone receptor (GHR); thymus; head kidney; gene expression; lymphocyte.

1 **1.Introduction**

2 The world food fish supplied from aquaculture practices has outpaced global population growth
3 in the last five decades. However, estimates predict that in the year 2021 per capita fish consumption
4 will increase in the world when compared with currently rates. In front of a finite food natural
5 resources, products derived from aquaculture need to continue contributing with the population
6 demands (FAO, 2012). In order to assist this scenario, biotechnology applied to aquaculture has been
7 used to generate genetic modified organisms. Specifically, the production of the transgenic fish that
8 overexpress growth hormone (GH) has been considered an interesting alternative to obtain faster
9 animal growth in less time farming (Ayoola and Idowu, 2008). Due that, several fish species have been
10 already genetically modified for GH overexpression (Chen et al., 1993; Devlin et al., 1994; Du et al.,
11 1992; Dunham et al., 1992; Rahman, 2001).

12 GH is produced in the anterior pituitary gland and released into blood stream, binding on cells
13 expressing the growth hormone receptor (GHR). In response of GH-GHR association, members of an
14 enzymatic family known as Janus Kinases (JAKs) in which are associated to the internal portion of GHR,
15 are transphosphorylate activating the intracellular signalization of GH. Activated, JAKs phosphorylate
16 tyrosine residues in specific regions of the receptor that, subsequently, serve as docking sites for other
17 signal mediators as proteins members of signal transducer and activators of transcription (STATs)
18 family. Once phosphorylated, STATs will form homo-heterodimers and migrate to nucleus in which will
19 exert the transcription control of several genes. Among the STATs inducible genes, are the suppressor
20 of cytokine signaling (SOCS), proteins characterized as a negative regulators of JAK/STAT pathway,
21 suppressing the cytokines responses (Zhu et al., 2001).

22 JAK/STAT signaling is activated by hormones as GH and for several immune cytokines involve in
23 innate and adaptive processes (O'Shea et al., 2002). In general, cytokine signaling is involved in the
24 inflammatory response, in the development of many lines of immune populations and in the
25 homeostatic control of periphery cells (Dimitriou et al., 2008). As in GH pathway, SOCS proteins play a
26 role as negative modulators this pathway coordinating the balance between the immune responses
27 (Alexander, 2002; Dimitriou et al., 2008). Due to these similarities the cross talk between GH and
28 immune system it was already established in mammalians. For example, it was observed that SOCS 1
29 and SOCS 3 induced by the cytokine CXCL12 were able to inhibited the GH responses *in vitro* and *in vivo*

1 (Garzón et al., 2004a). Furthermore, GH could act as cytokine in the immune system in vertebrates
2 taking into account that GHR receptor was characterized to be expressed in several cells and organs
3 (Meazza et al., 2004; Welniak et al., 2002; Yada, 2007). Thus, endocrine secretion of GH as well as its
4 paracrine and autocrine actions could modulate several immunological functions as was observed in
5 fish and mammals (Calduch-Giner et al., 1995; Sabharwal and Varma, 1996; Shved et al., 2011) . Due
6 to these interactions, it is necessary a deep investigation about the consequences of GH
7 overexpression under the immune system.

8 In order to contribute to understanding of the additional effects of GH excess under the
9 physiological systems our group developed a transgenic zebrafish (*Danio rerio*) lineage that
10 overexpresses this hormone under transcriptional control of β -actin gene promoter (Figueiredo et al.,
11 2007). Taking into account the interactions between GH and immune system established in the
12 literature, recently our group investigated the effects of GH on the immune system in this zebrafish
13 model. On contrary that we expect, the excess of GH caused several impairments suggesting the role of
14 GH on the developmental processes (Batista et al., 2014). Assumed the importance to generate GH
15 transgenic organisms for aquaculture proposes, it is necessary enforces in strategies to reduce or
16 compensate the collateral effects of GH on the others systems as immune system. To that end, our
17 group developed a second transgenic zebrafish strain that overexpress GHR only in the skeletal muscle,
18 aiming to improve the GH capture in this tissue and, consequently, to increase the growth rates
19 without the damage effects caused by GH excess (Figueiredo et al., 2012).

20 Based on the negative modulation exerted by GH on the immune functions in transgenic
21 zebrafish that overexpresses this hormone, it was believed that one possible alternative to compensate
22 the impairments caused by GH excess on the immune system and, at the same time, improve the fish
23 growth rate is to develop a double transgenic fish that overexpresses GH and GHR only in the skeletal
24 muscle. We therefore hypothesized that the damaging effects on the immune system in GH transgenic
25 zebrafish would be attenuate for GHR overexpression. To answer this question, we used four different
26 zebrafish genotypes obtained by crossing of two transgenic zebrafish lines: one that overexpresses GH
27 (Figueiredo et al., 2007) and other that overexpresses GHR in the skeletal muscle (Figueiredo et al.,
28 2012). In these progeny, was verified the immune-organs size, contents of CD3⁺ and CD4⁺ cells in the

1 thymus and head kidney and the levels of mRNA expression of the genes enrolled in the development
2 (*rag1* and *ikaros*), T-cell-related (*cd4-2* and *cd247*) and also cytokine (*il1b* and *ifnphi1*) genes.

3 **2. Materials and Methods**

4 **2.1 Transgenic fish lineages, crossings and maintenance conditions**

5 In this work, two zebrafish (*Danio rerio*) transgenic lineages were inter-crossed to generate the
6 double transgenic fish used in the experiments: the F0104 lineage that overexpresses GH under the
7 transcriptional control of *b-actin* promoter (Figueiredo et al., 2007), and the Myo-Red-GHR lineage,
8 which overexpresses GHR in the skeletal muscle under transcriptional control of the promoter of
9 *myosin light chain 2 (mylz2)* (Figueiredo et al., 2012). Males of F0104 lineage were crossed with
10 females Myo-Red-GHR, from these crossing was bred: Non-transgenic (NT), GH transgenic (GH), GHR
11 transgenic (GHR) and double transgenics fish (GH/GHR). The fish used in the experiments were
12 characterized according the fluorescence and maintained with a photoperiod controlled, as well as
13 chemical parameters of pH and nitrite concentration in the water. In addition, the animals were fed *ad*
14 *libitum* twice a day with commercial fish food (Tetrabits, Tetra, Brazil). All experiments were conducted
15 in accordance to the Ethics Committee on Animal Use of the Universidade Federal do Rio Grande.

16 **2.2 Histological and morphometric analysis**

17 Ten individuals of each lineage aged 30 days were euthanized with tricaine (0.6 mg/L) in order to
18 perform the histological and morphometric analyzes. For further immunohistochemical analysis, the
19 fish were fixed in Bouin's solution and processed according described for Prophet and colleagues
20 (1992). After that, the samples were submitted to the classic histology protocol, cut in longitudinal
21 sections (3-5 μ m) and subsequently stained with hematoxylin and eosin. The morphometric analysis of
22 the thymus, head kidney and spleen was made using the Weibel graticules, with lines, according to
23 Weibel (1982).

24 **2.3 Immunohistochemical analysis**

25 In the immunohistochemistry of the thymus and head kidney, the same animals processed for
26 histological analyses were used. The ABC peroxidase method was applied (Vectastain Elite ABC Kit,
27 Canada), as described by Hsu and colleagues (1981). The sections were incubated with a human
28 monoclonal antibody, anti CD3 and anti CD4 (Dako, Argentina) previously tested for fish in *Xiphophorus*

1 *helleri*. Next, the sections were washed (0.1% diaminobenzidine solution), dehydrated and the slides
2 were examined under an optical microscope. The evaluation of CD3 and CD4 receptors was performed
3 by quantitative analysis of the phenotypic percentage by μm^2 of tissue. The expression of these
4 receptors was quantified using Bioscan OPTIMAS 6.1 software.

5 **2.4 Analysis of gene expression**

6 For analysis of genes *rag1*, *ikzf1*, *cd247*, *cd42*, *il1b* and *ifnphi1*, five samples of each group both non
7 transgenic and transgenics were used, each sample consisting in one fish, all aged 30 days. Specific
8 primers (Table 1) for the genes of interest were designed based on sequences available in GenBank
9 using the Primer Express 3.0 software (Applied Biosystems, Brazil). The gene expression analysis was
10 performed according described previously in Batista et al., 2014. The genes of the *beta-2-microglobulin*
11 (*b2m*) and *ribosomal protein L13a (rpl113a)* were used as normalizer, which did not vary among
12 experimental groups.

13 **2.5 Statistical Analyses**

14
15 All statistical analyses performed in this work were done using One-way Anova test followed by
16 Tukey's *post hoc* test. Normality and homogeneity of variances were previously verified and significant
17 differences were inferred when $p < 0.05$. The gene expression data $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ were transformed in \log_{10} and
18 are expressed as mean \pm SEM of $-1/\log_{10}$ of $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$.

19 **3. Results**

20 **3.1 Histological and morphometric analysis**

21
22 Morphometric analysis of the thymus, head kidney and spleen were performed in order to verify
23 size differences of these organs among the groups (Fig. 1). Thymus length did not show variation
24 among transgenic groups (GH= $31.73 \mu\text{m} \pm 0.95$; GHR= $27.72 \mu\text{m} \pm 1.0$; GH/GHR= $27.60 \mu\text{m} \pm 0.97$).
25 However, transgenic zebrafish groups demonstrated lower thymus size when compared to NT (45.15
26 $\mu\text{m} \pm 1.34$) (Fig. 1A). Regarding the head kidney, NT ($76.83 \mu\text{m} \pm 1.8$) group demonstrated a larger head
27 kidney length than transgenic groups. GH transgenic fish ($63.93 \mu\text{m} \pm 0.88$) and GHR transgenic fish
28 ($68.85 \mu\text{m} \pm 1.88$) did not show significant variations, but GH-GHR transgenic fish ($49.72 \mu\text{m} \pm 0.80$)
29 suffered a significant decrease in head kidney length regarding the others fish groups (Fig. 1B). Spleen

1 morphometric analysis showed no differences in the comparison between GH ($28.77 \mu\text{m} \pm 1.04$) and
2 GH/GHR ($29.36 \mu\text{m} \pm 0.64$) groups, but these groups exhibited an increase in the spleen length
3 compared to GHR ($26.70 \mu\text{m} \pm 0.84$). Interestingly, NT group ($25.05 \mu\text{m} \pm 0.92$) revealed a stronger
4 reduction in its length when compared to GH and GH/GHR groups, did not showing differences when
5 compared to GHR (Fig. 1C).

6 **3.2 Analysis immunohistochemical**

7 Immunohistochemical analyses were performed in the thymus and head kidney to verify the
8 percentage of CD3 and CD4 cells in these organs (Fig. 2 and Fig. 3). In the thymus, CD3⁺ (Fig. 2A) and
9 CD4⁺ (Fig. 2B) cells content did not showed variation among GH (CD3⁺ = $19.02 \mu\text{m}^2 \pm 0.48$; CD4⁺ = 16.88
10 $\mu\text{m}^2 \pm 0.43$), GHR (CD3⁺ = $19.25 \mu\text{m}^2 \pm 0.55$; CD4⁺ = $16.66 \mu\text{m}^2 \pm 0.59$) and GH/GHR-transgenic fish
11 (CD3⁺ = $19.31 \mu\text{m}^2 \pm 0.64$; CD4⁺ = $18.60 \mu\text{m}^2 \pm 0.47$), although these groups revealed a decrease of CD3
12 and CD4 percentage relative to NT (CD3⁺ = $23.38 \mu\text{m}^2 \pm 0.72$; CD4⁺ = $27.64 \mu\text{m}^2 \pm 1.5$) (Fig. 2). Similarly,
13 in the head kidney the content of CD3⁺ (Fig. 3A) and CD4⁺ cells (Fig. 3B) in the transgenic groups
14 showed a significant impairment when compared with NT (CD3⁺ = $21.14 \mu\text{m}^2 \pm 0.53$; CD4⁺ = $17.11 \mu\text{m}^2 \pm$
15 0.83). In the comparison among transgenic groups the percentage of CD4⁺ cells did not show variation
16 (GH = $10.09 \mu\text{m}^2 \pm 0.21$; GHR = $10.06 \mu\text{m}^2 \pm 0.16$; GH/GHR = $10.54 \mu\text{m}^2 \pm 0.23$), however the percentage
17 of CD3 cells were higher in GH/GHR-transgenic fish (CD3⁺ = $12.99 \mu\text{m}^2 \pm 0.51$) than GH (CD3⁺ = 11.09
18 $\mu\text{m}^2 \pm 0.15$) and GHR-transgenic fish (CD3⁺ = $10.75 \mu\text{m}^2 \pm 0.23$) (Fig. 3).

19 **3.3 Gene expression analysis**

20 Gene expression analyses were performed to verify differences in the immunity-related genes
21 among NT, GH, GHR and GH/GHR zebrafish strains (Fig. 4). *rag1* was down regulated in GHR and
22 GH/GHR groups in comparison to NT; moreover this gene was also down regulated in GH/GHR group in
23 the comparison to GH (Fig. 4A). *ifnphi1* mRNA was down regulated in GHR and GH/GHR groups in
24 comparison to NT and GH groups (Fig. 4E). The gene expression levels of *ikzf* (Fig. 4B), *cd4-2* (Fig. 4C),
25 *cd247* (Fig. 4D) and *il1b* (Fig. 4E) did not show variation among the groups.

26 **4. Discussion**

27 In the aquaculture scenario, the development of the transgenic organisms that overexpress GH
28 has been shown a viable alternative to obtain a faster fish growing. However, recent studies have been

1 revealed that GH overexpression can affect several others physiological systems, such as the immune
2 system (Codner and Cassorla, 2002; Hattori, 2009; Sagazio et al., 2011; Sakamoto and McCormick,
3 2006). In this context, it was believed that the impairments caused by GH overexpression could be
4 overcome by GHR simultaneous transgenesis, leading to a higher growth rate without GH negatives
5 effects. In this study, we have shown that GHR overexpression does not attenuate the GH excess
6 damaging in transgenic zebrafish immune system. In our experiments, the size of the immune-organs,
7 the CD3⁺ and CD4⁺ cells contents in the thymus and head kidney, and the expression of immune-related
8 genes in GH/GHR transgenic fish were not recovered.

9 The excess of the GH has been reported to be responsible for several damages on the immune
10 system in GH transgenic zebrafish (Batista et al., 2014). Based on these evidences, we evaluated if the
11 simultaneous overexpression of GHR is able to attenuate the effects of GH excess. Our results revealed
12 that GH/GHR transgenic fish did not present variations in the size of the thymus and spleen when
13 compared to GH transgenic fish, being the head kidney development dramatically impaired in this
14 lineage. These results are an indicative that the processes towards immune organs development are
15 impaired in GH/GHR transgenic fish as was previously observed in GH transgenic fish. In our previous
16 study, we hypothesized that the injuries on the immune system in GH transgenic fish were related
17 mainly to impairments in the aspects of the immune-organs development. We consider that processes
18 of colonization by hematopoietic stem cells (HSCs) are compromised due the GH excess and the
19 higher levels of the suppressors of cytokine signaling proteins (SOCS) (Batista et al., 2014). Garzón and
20 colleagues (2004), showed that the up-regulation of SOCS3 is related to a decreased migration of B
21 cells and, macrophages/granulocytes in the spleen, lymph nodes and bone marrow in GH transgenic
22 mice (Garzón et al., 2004b). These authors suggested that SOCS3 is capable of interacting with CXCR4
23 receptor, damaging the chemotactic responses generated by the cytokine CXCL2 (Garzón et al., 2004b).
24 Previously, we demonstrated that GH overexpression can lead to high levels of SOCS 1 and SOCS 3 in the
25 liver (Studzinski et al., 2009), muscle and brain in zebrafish (data not published). Thus, we are
26 considering that the migration processes to colonization of the thymus and head kidney in GH/GHR
27 transgenic may be impaired through similar mechanisms. Therefore, this observation suggests that the
28 simultaneous GHR overexpression in the skeletal muscle is not able to reduce the levels of GH
29 circulating at the point to attenuate the effects of this hormone in hematopoietic and immune cells. On

1 the other hand, we reported an increase in the spleen length in GH and GH/GHR transgenic fish. In fact,
2 the high levels of GH has been already reported to be responsible to increase the metabolic rate in GH
3 transgenic fish species, including zebrafish (Rosa et al., 2008). Physiologically, in response to a higher
4 metabolism and oxygen consumption it has been known that organisms could be able to increase the
5 hematocrit. In this way, the spleen increased in GH and GH/GHR transgenic fish might arise as a result
6 of an elevated number of red blood cells.

7 Unexpectedly, transgenic zebrafish overexpressing GHR receptor only in skeletal muscle
8 revealed a decrease in the size of the thymus and head kidney comparable to GH transgenic fish. In
9 fact, these intriguingly results are not related to the direct effects of GH excess in these fish. However,
10 it is possible that GHR transgenesis could exert indirect influences on the immune system. Indeed,
11 data not published from our research group suggest that GHR receptor could suffer nuclear
12 translocation, acting as an auxiliary transcription factor in skeletal muscle of GHR transgenic zebrafish.
13 As a result of this translocation, GHR could not be available in plasmatic membrane, reducing GH
14 binding and intracellular signaling. Thus, GH/GHR transgenics might be suffering effects coming
15 from GH circulating excess plus unpredictable systemic effects of muscle GHR overexpression.

16 Taking into account the thymus and head kidney decrease in the transgenics, we performed
17 immunohistochemistry analyzes to verify the content of CD3⁺ and CD4⁺ cells in these organs. We
18 have found that GH, GHR and GH/GHR transgenic fish decreased the number of CD3⁺ and CD4⁺
19 thymocytes in average of 18% and 37% respectively, regarding to NT. These results reaffirmed the
20 indication that there is a reduced number of HSCs migrating to the thymus and consequently in
21 maturation process, fact evidenced by the reduction of CD4⁺ cells. Similarly, we have found that the
22 percentage of CD3⁺ and CD4⁺ cells in head kidney also decreased in all transgenics fish concerning to NT
23 (45% and 40%, respectively) indicating a dramatically reduced number of cells that emigrated from
24 thymus. Biologically, T cells perform critical functions in specific immunological responses through
25 cytokines secretion coordinating several immune cells. Thus, the CD3⁺ and CD4⁺ reduction in these
26 transgenic genotypes implies in effects on macrophages, NK cells, eosinophils as well as CD8⁺ and B
27 cells activity, influencing the immune activity as a whole.

28 Some evidences have been shown that SOCS are involved in the mechanisms of T cell
29 maturation, differentiation and function (Palmer and Restifo, 2009) and might be also responsible for

1 the phenotype observed in GH and GH/GHR transgenic fish. For example, up-regulation of SOCS1 in T
2 cells resulted in cellularity injury and in thymus development, as well as an enhanced apoptosis in the
3 periphery T cells in transgenic mice (Fujimoto et al., 2000). Corroborating with that, transgenic mice
4 overexpressing SOCS1 demonstrated that naive CD4⁺ T cells are unable to survive when emigrates from
5 thymus (Seki et al., 2007). These studies reinforce a tight relationship between the overexpression of
6 SOCS and the damage on the CD3⁺ and CD4⁺ cells observed in GH and GH/GHR transgenic fish.
7 However, the fact that GHR transgenic group presents the same damage patterns observed in the
8 other transgenic groups raised some questions: how the GHR overexpression in the skeletal muscle
9 impairs the immune organs development and consequently the T cell amounts? Does the GHR nuclear
10 translocation deregulates genes that can be involved in these observations? In spite of that, we do not
11 have the answers for these questions; intriguing mechanisms may be involved and more investigations
12 are needed to clarify.

13 According to the reduction observed in the immune-organs and the decreased number of CD3⁺
14 and CD4⁺ cells in thymus and head kidney in transgenic genotypes, we presumed to found alterations
15 in the immune-related genes expression. Indeed, the down-regulation of *rag1* gene in GH, GHR and
16 GH/GHR transgenic might be related to the observed reduction in of CD3⁺ and CD4⁺ cells number.
17 Taking into account the role of *rag1* gene in the T cell fate, the down-regulation of this gene impairs
18 the TCR formation decreasing the number of mature CD3⁺ and CD4⁺ T cells. However, the expression of
19 the transcription factor *ikzf1* did not show variation among all transgenic genotypes analyzed,
20 indicating that there was no damage in T-lineage commitment processes. Moreover, despites the
21 reduction of CD3⁺ and CD4⁺ cells in transgenics groups, the expression of *cd4-2* and *cd247* receptors did
22 not change. Likewise, the gene of proinflammatory cytokine *il1b* did not variate among the groups
23 suggesting that this cytokine was not induced in genic level. Interestinly, the *ifnphi1* gene was up-
24 regulated in the GHR and GH/GHR groups. Considering that these groups have in common the GHR
25 transgenesis, this result might be linked to an effects occasionated by transgenesis itself. However, the
26 *ifnphi1* up-regulation could be an indicative of infection susceptibility in these groups.

27 In summary, this study shows that the simultaneous GHR overexpression in the skeletal muscle
28 does not attenuate the impairment of immune parameters caused by GH excess in transgenic
29 zebrafish. In both, GH and GH/GHR transgenic fish, the most of immunological parameters evaluated

1 were decreased regarding NT, reaffirming the importance to maintenance the physiological levels of
2 GH to proper functioning and development of the immune system. Intriguingly, GHR group, which does
3 not overexpresses GH, the parameters evaluated showed the same pattern observed in the other
4 transgenic groups. Overall, we reported here that genetic modification of the somatotropic axis genes
5 is damaging the immune functions in zebrafish. In order to understand this scenario, more studies are
6 needed to clarify what are the mechanisms behind these damages and what are the consequences of
7 the effects reported here in immune response as a whole.

8

5. Annexes

Table 1. Gene-specific primers used for quantitative PCR expression analyses

Gene	Primer sequence	GeneBank accession number
<i>recombination activating gene 1 (rag1)</i>	F: 5"-AGCTGACCCATGGAGAAAGGGA-3" R: 5"-ACAGTTCGTCAGGCATGGAGGC-3"	NM_131389.1
<i>ikaros zinc finger 1 (Ikzf1)</i>	F: 5"-GCCGACATGGTGGTCAGCCC-3" R: 5"-GTGCTCTGCGGCGCTGTCTT-3"	AF416371.1
<i>cd247 antigen (cd247)</i>	F: 5"-GATCTGGAGGTCGCAGGCGTG-3" R: 5"-ACGGTACGTGTCGTCCTCCCTT-3"	EF601086.1
<i>cd4-2 protein (cd4-2)</i>	F: 5"-GGTTCTGGTGCCACTGATCCTTGG-3" R: 5"-AGAGGCTGCCGCATGGATCTCA-3"	EF601915.1
<i>interleukin 1, beta (il1b)</i>	F: 5"-CCACGTATGCGTCGCCCAAGT-3" R: 5"-GGGCAACAGGCCAGGTACAGG-3"	BC098597.1
<i>Interferon phi 1 (ifnphi1)</i>	F: 5"-AGCATGGGAGCAGATCCGGA-3" R: 5"-TGACCCTTGCGTTGCTTGCGA-3"	BC162493.1
<i>ribosomal protein L13a (rpl13a)</i>	F: 5"-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3" R: 5"-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3"	NM_212784.1
<i>beta-2-microglobulin (b2m)</i>	F: 5"-GCCTTCACCCAGAGAAAGG-3" R: 5"-GCGGTTGGGATTACATGTTG-3"	NM_001159768.1

Figure 1. Histological analysis

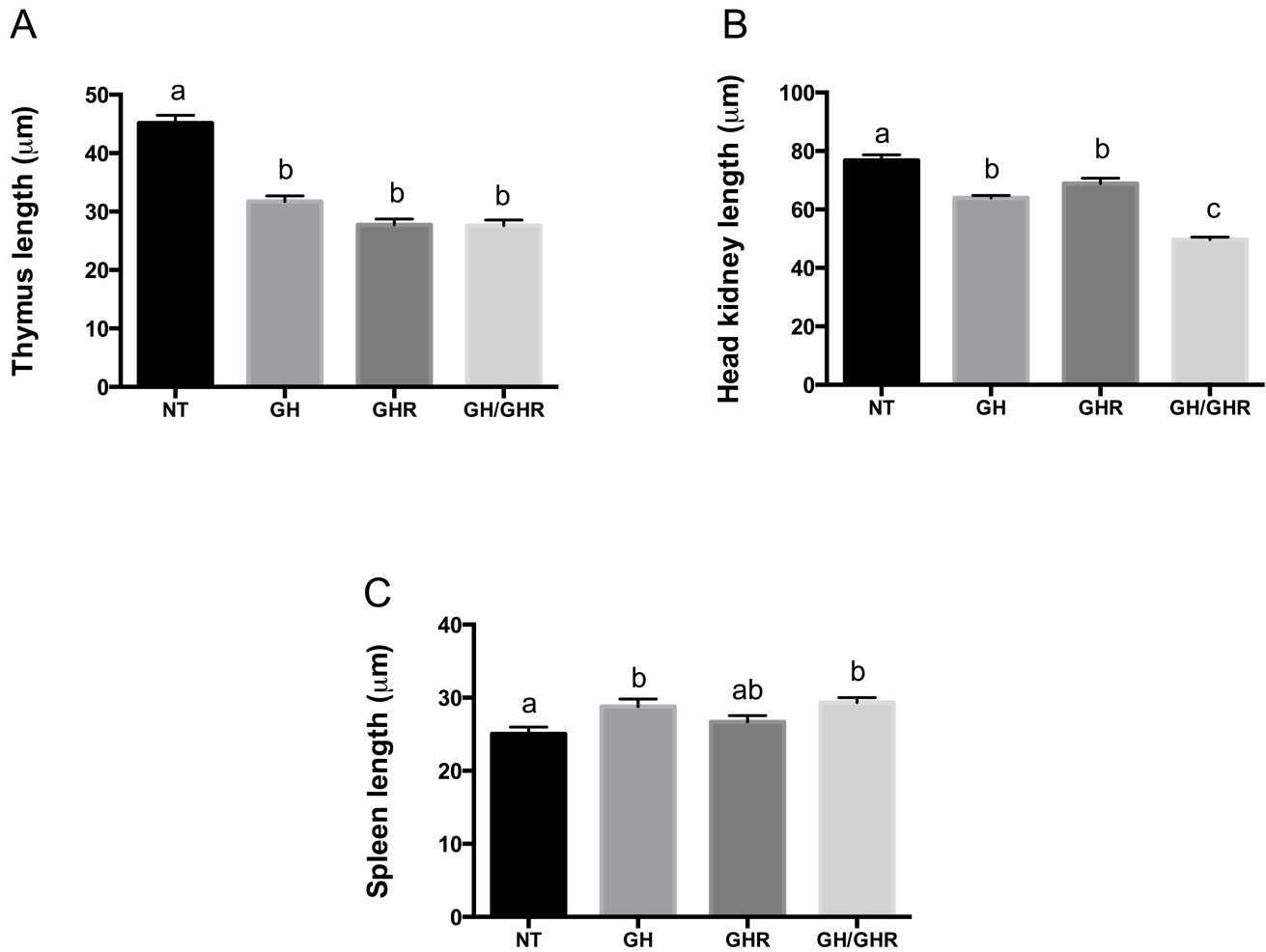


Fig. 1 Morphometric analysis of the thymus (A), head kidney (B) and spleen (C) comparing non-transgenic (NT), GH-transgenic (GH), GHR-transgenic (GHR) and GH-GHR transgenic zebrafish (GH/GHR). Different letters (a, b and c) indicate differences among the groups. Data are expressed using a mean \pm SEM. (One-way ANOVA, $p < 0.05$)

Figure 2. Thymus immunohistochemistry

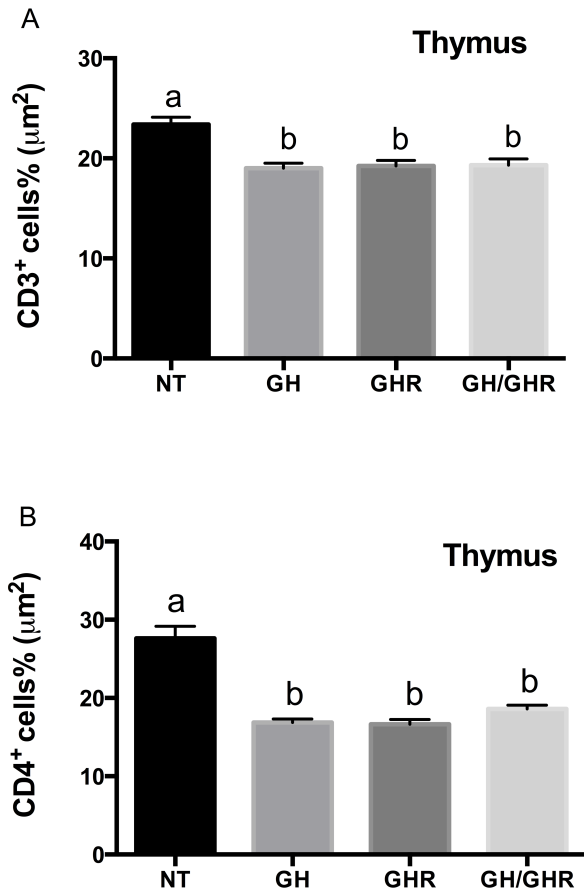


Fig. 2 Phenotypic expression of CD3⁺ (A) and CD4⁺ (B) receptors in the thymus of non-transgenic (NT), GH-transgenic (GH), GHR-transgenic (GHR) and GH-GHR transgenic zebrafish (GH/GHR). Data are expressed as percentage of marked cells area (μm^2). Different letters (**a**, **b** and **c**) indicate significant differences among the groups. Data are expressed using a mean \pm SEM. (One-way ANOVA, $p < 0.05$).

Figure 3. Head kidney immunohistochemistry

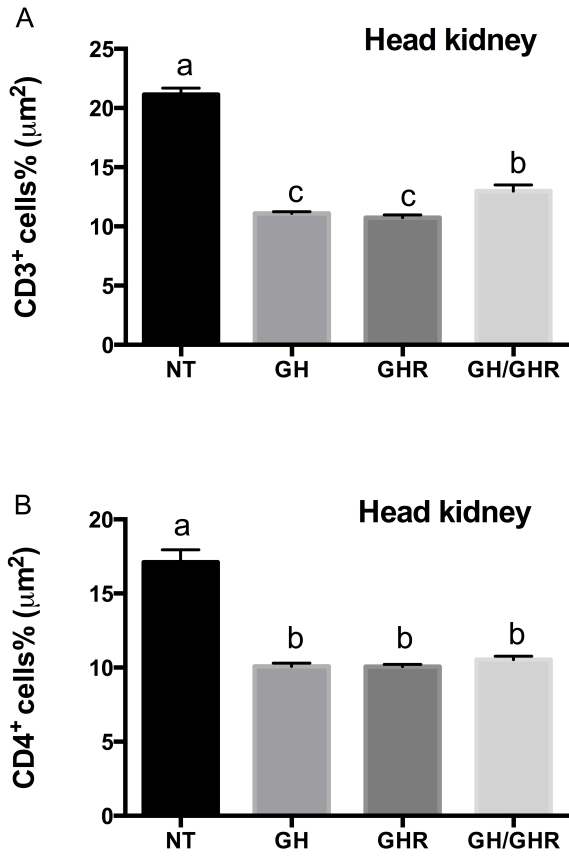


Fig. 3 Phenotypic expression of CD3⁺ (A) and CD4⁺ (B) receptors in the head kidney of non-transgenic (NT), GH-transgenic (GH), GHR-transgenic (GHR) and GH-GHR transgenic zebrafish (GH/GHR). Data are expressed as percentage of marked cells area (µm²). Different letters (**a**, **b** and **c**) indicate differences among the groups. Data are expressed using a mean ± SEM (One-way ANOVA, p < 0.05).

Figure 4. Gene expression analysis

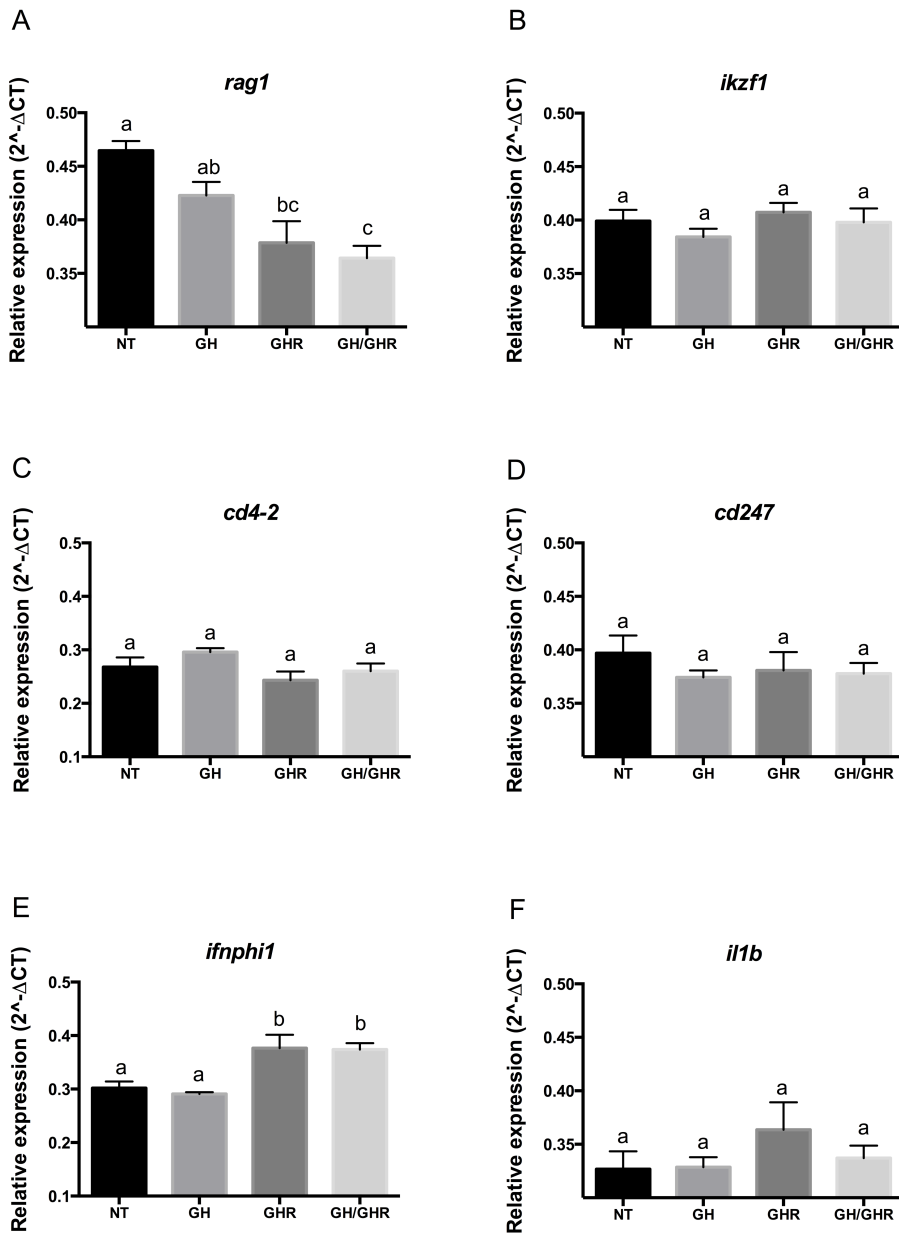


Fig. 4 Gene expression analyses of the immune system-related genes comparing non-transgenic (NT), GH-transgenic (GH), GHR-transgenic (GHR) and GH-GHR transgenic zebrafish (GH/GHR). For each gene analyzed the expression level was normalized by the expression of the beta-2-microglubulin (*b2m*) and ribosomal protein 113 (*rpl13*) genes. Significant differences ($p < 0.05$) among the groups are denoted by different letters (**a**, **b** and **c**). Data are expressed as $-1/\log_{10}$ of the relative expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) \pm SEM.

6. References

- Alexander, W.S., 2002. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 410–6. doi:10.1038/nri818
- Ayoola, S.O., Idowu, A.A., 2008. Biotechnology and species development in aquaculture. *African J. Biotechnol.* 7, 4722–4725.
- Batista, C.R., Figueiredo, M. a, Almeida, D. V, Romano, L. a, Marins, L.F., 2014. Impairment of the immune system in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 36, 519–24. doi:10.1016/j.fsi.2013.12.022
- Calduch-Giner, J.A., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez, J., 1995. Evidence for a direct action of GH on haemopoietic cells of a marine fish, the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *J. Endocrinol.* 146, 459–467. doi:10.1677/joe.0.1460459
- Chen, T.T., Kight, K., Lin, C.M., Powers, D.A., Hayat, M., Chatakondi, N., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Dunham, R.A., 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2, 88–95.
- Codner, E., Cassorla, F., 2002. Growth hormone and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186, 133–136. doi:10.1016/S0303-7207(01)00653-0
- Devlin, R., Yesaki, T., Biagi, C., 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*.
- Dimitriou, I.D., Clemenza, L., Scotter, A.J., Chen, G., Guerra, F.M., Rottapel, R., 2008. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol. Rev.* 224, 265–83. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00659.x
- Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew, C.L., 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology. (N. Y.)* 10, 176–81.
- Dunham, R.A., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Hayat, M., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Gonzalez-Villasenor, I., Powers, D.A., 1992. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, 380–9.
- FAO, 2012. *The State of World Fisheries and Aquaculture*. food Agric. Organ. United Nations Rome, Italy.
- Figueiredo, M.A., Mareco, E.A., Silva, M.D.P., Marins, L.F., 2012. Muscle-specific growth hormone receptor (GHR) overexpression induces hyperplasia but not hypertrophy in transgenic zebrafish. *Transgenic Res.* 21, 457–69. doi:10.1007/s11248-011-9546-2

- Figueiredo, M.D.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2007. Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30, 31–36. doi:10.1590/S1415-47572007000100008
- Fujimoto, M., Naka, T., Nakagawa, R., Kawazoe, Y., Morita, Y., Tateishi, A., Okumura, K., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2000. Defective thymocyte development and perturbed homeostasis of T cells in STAT-induced STAT inhibitor-1/suppressors of cytokine signaling-1 transgenic mice. *J. Immunol.* 165, 1799–806. doi:10925257
- Garzón, R., Soriano, S.F., Rodríguez-Frade, J.M., Gómez, L., Martín de Ana, A., Sánchez-Gómez, M., Martínez-A, C., Mellado, M., 2004a. CXCR4-mediated suppressor of cytokine signaling up-regulation inactivates growth hormone function. *J. Biol. Chem.* 279, 44460–6. doi:10.1074/jbc.M408010200
- Garzón, R., Soriano, S.F., Rodríguez-Frade, J.M., Gómez, L., Martín de Ana, A., Sánchez-Gómez, M., Martínez-A, C., Mellado, M., 2004b. CXCR4-mediated suppressor of cytokine signaling up-regulation inactivates growth hormone function. *J. Biol. Chem.* 279, 44460–6. doi:10.1074/jbc.M408010200
- Hattori, N., 2009. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.* 19, 187–97. doi:10.1016/j.ghir.2008.12.001
- Meazza, C., Pagani, S., Travaglino, P., Bozzola, M., 2004. Effect of growth hormone (GH) on the immune system. *Pediatr. Endocrinol. Rev.* 1 Suppl 3, 490–5.
- O’Shea, J.J., Gadina, M., Schreiber, R.D., 2002. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl, S121–31.
- Palmer, D.C., Restifo, N.P., 2009. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol.* 30, 592–602. doi:10.1016/j.it.2009.09.009
- Rahman, M., 2001. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *J. Fish Biol.* 59, 62–78. doi:10.1006/jfbi.2001.1622
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D. V, Monserrat, J.M., Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 209–14. doi:10.1016/j.cbpb.2007.09.010
- Sabharwal, P., Varma, S., 1996. Growth hormone synthesized and secreted by human thymocytes acts via insulin-like growth factor I as an autocrine and paracrine growth factor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81, 2663–9. doi:10.1210/jcem.81.7.8675594

- Sagazio, A., Shohreh, R., Salvatori, R., 2011. Effects of GH deficiency and GH replacement on inter-male aggressiveness in mice. *Growth Horm. IGF Res.* 21, 76–80. doi:10.1016/j.ghir.2011.01.002
- Sakamoto, T., McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 24–30. doi:10.1016/j.ygcen.2005.10.008
- Seki, Y.-I., Yang, J., Okamoto, M., Tanaka, S., Goitsuka, R., Farrar, M. a, Kubo, M., 2007. IL-7/STAT5 cytokine signaling pathway is essential but insufficient for maintenance of naive CD4 T cell survival in peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* 178, 262–70.
- Shved, N., Berishvili, G., Mazel, P., Baroiller, J.-F., Eppler, E., 2011. Growth hormone (GH) treatment acts on the endocrine and autocrine/paracrine GH/IGF-axis and on TNF- α expression in bony fish pituitary and immune organs. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 944–52. doi:10.1016/j.fsi.2011.08.012
- Studzinski, A.L.M., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo, M. de A., Marins, L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67–72. doi:10.1016/j.ygcen.2008.10.008
- Welniak, L. a, Sun, R., Murphy, W.J., 2002. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *J. Leukoc. Biol.* 71, 381–7.
- Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 353–8. doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.045
- Zhu, T., Goh, E.L., Graichen, R., Ling, L., Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* 13, 599–616.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Contrariando nossa hipótese principal, este estudo mostrou que a superexpressão do GHR no músculo esquelético não é capaz de amenizar os efeitos negativos exercidos pelo GH sobre as funções imunológicas. Ainda, surpreendentemente, a transgenia para o GHR por si só revelou-se capaz de causar efeitos similares aqueles observados nos transgênicos para o GH e para o GH/GHR. Esse fato sugere que o GHR prejudica aspectos do sistema imunológico por mecanismos, até então, desconhecidos nesta linhagem. Dessa forma, os prejuízos evidenciados na linhagem dos duplo transgênicos GH/GHR podem acontecer por intermédio do excesso de GH ou GHR, como também pela ação de ambos. Devido à alta correlação das SOCS com os componentes da imunidade e a sinalização do GH, experimentos devem ser realizados afim de esclarecer estas relações. Da mesma forma, se faz necessário esforços afim de entender como a translocação nuclear do receptor do GHR (dados anteriores) poderia estar contribuindo ou não para os danos observados. A maioria dos aspectos da imunidade avaliados nesse trabalho são componentes imunes que participam dos processos adaptativos. Apesar dos danos observados, que consequentemente estão influenciando nas respostas imunes globais destes organismos, os transgênicos não são totalmente deplecionados de imunidade específica. Entretanto, afim de verificar o quanto os prejuízos evidenciados refletem em diferenças nas respostas imunológicas e na susceptibilidade e resistência à infecções é necessário conduzir um desafio com patógeno. De maneira geral, este estudo reafirma a importância da manutenção da homeostasia do organismo para o funcionamento adequado dos sistemas fisiológicos.

4. BIBLIOGRAFIA GERAL

- Almeida, D.V., Bianchini, A., Marins, L.F., 2013a. Growth hormone overexpression generates an unfavorable phenotype in juvenile transgenic zebrafish under hypoxic conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 194, 102–9. doi:10.1016/j.ygcen.2013.08.017
- Almeida, D.V., de Martinez Gaspar Martins, C., de Azevedo Figueiredo, M., Lanes, C.F.C., Bianchini, A., Marins, L.F., 2013b. Growth hormone transgenesis affects osmoregulation and energy metabolism in zebrafish (*Danio rerio*). *Transgenic Res.* 22, 75–88. doi:10.1007/s11248-012-9627-x
- Ayoola, S.O., Idowu, A.A., 2008. Biotechnology and species development in aquaculture. *African J. Biotechnol.* 7, 4722–4725.
- Batista, C.R., Figueiredo, M. a, Almeida, D. V, Romano, L. a, Marins, L.F., 2014. Impairment of the immune system in GH-overexpressing transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol.* 36, 519–24. doi:10.1016/j.fsi.2013.12.022
- Bevan, M.J., 2004. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 595–602. doi:10.1038/nri1413
- Boehm, T., Bleul, C.C., 2006. Thymus-homing precursors and the thymic microenvironment. *Trends Immunol.* 27, 477–84. doi:10.1016/j.it.2006.08.004
- Calduch-Giner, J., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Perez-Sanchez, J., 1997. Growth hormone as an in vitro phagocyte-activating factor in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Cell Tissue Res.* 287, 535–40.
- Ceredig, R., Rolink, A.G., Brown, G., 2009. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 293–300. doi:10.1038/nri2525
- Chen, T.T., Kight, K., Lin, C.M., Powers, D.A., Hayat, M., Chatakondi, N., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Dunham, R.A., 1993. Expression and inheritance of RSVLTR-rtGH1 complementary DNA in the transgenic common carp, *Cyprinus carpio*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2, 88–95.
- Cnaani, A., McLean, E., Hallerman, E.M., 2013. Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* 412-413, 107–116. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.06.029
- Codner, E., Cassorla, F., 2002. Growth hormone and reproductive function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 186, 133–136. doi:10.1016/S0303-7207(01)00653-0
- Figueiredo, M. A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Proietti, M.C., Marins, L.F., 2007. The effect of GH overexpression on GHR and IGF-I gene regulation in different genotypes of GH-transgenic

zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. Part D. Genomics Proteomics* 2, 228–33.
doi:10.1016/j.cbpd.2007.04.004

Dorshkind, K., Horseman, N.D., 2000. The roles of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormones in lymphocyte development and function: insights from genetic models of hormone and hormone receptor deficiency. *Endocr. Rev.* 21, 292–312.
doi:10.1210/edrv.21.3.0397

Du Pasquier, L., 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129, 1–15.

Du, S.J., Gong, Z.Y., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Idler, D.R., Hew, C.L., 1992. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an “all fish” chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology. (N. Y.)* 10, 176–81.

Dunham, R.A., Ramboux, A.C., Duncan, P.L., Hayat, M., Chen, T.T., Lin, C.M., Kight, K., Gonzalez-Villasenor, I., Powers, D.A., 1992. Transfer, expression, and inheritance of salmonid growth hormone genes in channel catfish, *Ictalurus punctatus*, and effects on performance traits. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1, 380–9.

FAO, 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture. food Agric. Organ. United Nations Rome, Italy.

Figueiredo, M. a, Fernandes, R. V, Studzinski, A.L., Rosa, C.E., Corcini, C.D., Junior, A.S.V., Marins, L.F., 2013. GH overexpression decreases spermatid parameters and reproductive success in two-years-old transgenic zebrafish males. *Anim. Reprod. Sci.* 139, 162–7.
doi:10.1016/j.anireprosci.2013.03.012

Figueiredo, M.D.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D.V., Marins, L.F., 2007. Improving the production of transgenic fish germlines: in vivo evaluation of mosaicism in zebrafish (*Danio rerio*) using a green fluorescent protein (GFP) and growth hormone cDNA transgene co-injection strategy. *Genet. Mol. Biol.* 30, 31–36. doi:10.1590/S1415-47572007000100008

Fisheries and Aquaculture topics. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Topics Fact Sheets., © FAO 2008. ed, 2012.

Fugmann, S.D., 2010. The origins of the Rag genes--from transposition to V(D)J recombination. *Semin. Immunol.* 22, 10–6. doi:10.1016/j.smim.2009.11.004

Fujimoto, M., Naka, T., Nakagawa, R., Kawazoe, Y., Morita, Y., Tateishi, A., Okumura, K., Narazaki, M., Kishimoto, T., 2000. Defective thymocyte development and perturbed homeostasis of T cells in STAT-induced STAT inhibitor-1/suppressors of cytokine signaling-1 transgenic mice. *J. Immunol.* 165, 1799–806. doi:10925257

- Garzón, R., Soriano, S.F., Rodríguez-Frade, J.M., Gómez, L., Martín de Ana, A., Sánchez-Gómez, M., Martínez-A, C., Mellado, M., 2004. CXCR4-mediated suppressor of cytokine signaling up-regulation inactivates growth hormone function. *J. Biol. Chem.* 279, 44460–6. doi:10.1074/jbc.M408010200
- Gorissen, M., de Vrieze, E., Flik, G., Huising, M.O., 2011. STAT genes display differential evolutionary rates that correlate with their roles in the endocrine and immune system. *J. Endocrinol.* 209, 175–84. doi:10.1530/JOE-11-0033
- Greenhalgh, C.J., Alexander, W.S., 2004. Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm. IGF Res.* 14, 200–6. doi:10.1016/j.ghir.2003.12.011
- Hattori, N., 2009. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. *Growth Horm. IGF Res.* 19, 187–97. doi:10.1016/j.ghir.2008.12.001
- Herrington, J., Carter-Su, C., 2001. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 12, 252–7.
- Jhingan, E., Devlin, R.H., Iwama, G.K., 2003. Disease resistance, stress response and effects of triploidy in growth hormone transgenic coho salmon. *J. Fish Biol.* 63, 806–823. doi:10.1046/j.1095-8649.2003.00194.x
- Jiang, L., Zhang, J., Wang, J.-J., Wang, L., Zhang, L., Li, G., Yang, X., Ma, X., Sun, X., Cai, J., Zhang, J., Huang, X., Yu, M., Wang, X., Liu, F., Wu, C.-I., He, C., Zhang, B., Ci, W., Liu, J., 2013. Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos. *Cell* 153, 773–84. doi:10.1016/j.cell.2013.04.041
- Kawamoto, H., Ikawa, T., Masuda, K., Wada, H., Katsura, Y., 2010. A map for lineage restriction of progenitors during hematopoiesis: the essence of the myeloid-based model. *Immunol. Rev.* 238, 23–36. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00959.x
- Kondo, M., Weissman, I.L., Akashi, K., 1997. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661–72.
- Levraud, J., Boudinot, P., 2009. [The immune system of teleost fish]. *Med. Sci. (Paris)*. 25, 405–11. doi:10.1051/medsci/2009254405
- Li, M., Leatherland, J.F., 2013. The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system of teleostean embryos: lessons learned from mammalian studies. *Fish Fish.* 14, 528–553. doi:10.1111/j.1467-2979.2012.00486.x
- Love, P.E., Bhandoola, A., 2011. Signal integration and crosstalk during thymocyte migration and emigration. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 469–77. doi:10.1038/nri2989

- Maisey, K., Imarai, M., 2011. Diversity of teleost leukocyte molecules: role of alternative splicing. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 663–72. doi:10.1016/j.fsi.2010.08.001
- Mazzoccoli, G., Giuliani, F., Inglese, M., Marzulli, N., Dagostino, M., De Cata, A., Greco, A., Carughi, S., Tarquini, R., 2010. Chronobiologic study of the GH-IGF1 axis and the ageing immune system. *J. Appl. Biomed.* 8, 213–226. doi:10.2478/v10136-009-0028-2
- Mercier, F.E., Ragu, C., Scadden, D.T., 2012. The bone marrow at the crossroads of blood and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 49–60. doi:10.1038/nri3132
- Moyes, C.D., Schulte, P.M., 2010. *Princípios em Fisiologia Animal*, 2th ed. Artmed, Porto Alegre.
- Nam, B.-H., Moon, J.-Y., Kim, Y.-O., Kong, H.J., Kim, W.-J., Kim, K.-K., Lee, S.-J., 2011. Molecular and functional analyses of growth hormone-releasing hormone (GHRH) from olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 159, 84–91. doi:10.1016/j.cbpb.2011.02.006
- Ouyang, S., He, F., 2003. Phylogeny of a growth hormone-like cytokine superfamily based upon 3D structure. *J. Mol. Evol.* 56, 131–6. doi:10.1007/s00239-002-2385-2
- Palmer, D.C., Restifo, N.P., 2009. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol.* 30, 592–602. doi:10.1016/j.it.2009.09.009
- Piganis, R. a R., De Weerd, N. a, Gould, J. a, Schindler, C.W., Mansell, A., Nicholson, S.E., Hertzog, P.J., 2011. Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon alpha receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. *J. Biol. Chem.* 286, 33811–8. doi:10.1074/jbc.M111.270207
- Press, C.M., Evensen, Ø., 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. *Fish Shellfish Immunol.* 9, 309–318. doi:10.1006/fsim.1998.0181
- Rahman, M., 2001. Growth and nutritional trials on transgenic Nile tilapia containing an exogenous fish growth hormone gene. *J. Fish Biol.* 59, 62–78. doi:10.1006/jfbi.2001.1622
- Rasquin, P., 1951. Effects of carp pituitary and mammalian ACTH on the endocrine and lymphoid systems of the teleost *Astyanax mexicanus*. *J. Exp. Zool.* 117, 317–357. doi:10.1002/jez.1401170206
- Rosa, C.E., Figueiredo, M.A., Lanes, C.F.C., Almeida, D. V, Monserrat, J.M., Marins, L.F., 2008. Metabolic rate and reactive oxygen species production in different genotypes of GH-transgenic zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 149, 209–14. doi:10.1016/j.cbpb.2007.09.010
- Rosa, C.E. Da, Kuradomi, R.Y., Almeida, D.V., Lannes, C.F.C., Figueiredo, M.D.A., Dytz, A.G., Fonseca, D.B., Marins, L.F., 2010. GH overexpression modifies muscle expression of anti-oxidant enzymes

and increases spinal curvature of old zebrafish. *Exp. Gerontol.* 45, 449–56. doi:10.1016/j.exger.2010.03.012

Rosenthal, N., Ashburner, M., 2002. Taking stock of our models: the function and future of stock centres. *Nat. Rev. Genet.* 3, 711–7. doi:10.1038/nrg891

Sagazio, A., Shohreh, R., Salvatori, R., 2011. Effects of GH deficiency and GH replacement on inter-male aggressiveness in mice. *Growth Horm. IGF Res.* 21, 76–80. doi:10.1016/j.ghir.2011.01.002

Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., Tonegawa, S., 1984. Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309, 757–762. doi:10.1038/309757a0

Sakamoto, T., McCormick, S.D., 2006. Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147, 24–30. doi:10.1016/j.ygcen.2005.10.008

Seki, Y.-I., Yang, J., Okamoto, M., Tanaka, S., Goitsuka, R., Farrar, M. a, Kubo, M., 2007. IL-7/STAT5 cytokine signaling pathway is essential but insufficient for maintenance of naive CD4 T cell survival in peripheral lymphoid organs. *J. Immunol.* 178, 262–70.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 83, 13–34. doi:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

Steiner, L.A., Willett, C.E., Danilova, N., 2004. The Zebrafish Immune System. *Mol. Biol. B cells* 29, 449–472.

Studzinski, A.L.M., Almeida, D.V., Lanes, C.F.C., Figueiredo, M. de A., Marins, L.F., 2009. SOCS1 and SOCS3 are the main negative modulators of the somatotrophic axis in liver of homozygous GH-transgenic zebrafish (*Danio rerio*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 161, 67–72. doi:10.1016/j.ygcen.2008.10.008

Sunshine, G., Coico, R., 2010. *Imunologia*, 6th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Trede, N.S., Langenau, D.M., Traver, D., Look, A.T., Zon, L.I., 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity* 20, 367–79.

Trop, S., 2001. Overexpression of suppressor of cytokine signaling-1 impairs pre-T-cell receptor-induced proliferation but not differentiation of immature thymocytes. *Blood* 97, 2269–2277. doi:10.1182/blood.V97.8.2269

Wang, W.-B., Wang, Y.-P., Hu, W., Li, A., Cai, T., Zhu, Z.-Y., Wang, J.-G., 2006. Effects of the “all-fish” growth hormone transgene expression on non-specific immune functions of common carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture* 259, 81–87. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.05.016

- Yada, T., 2007. Growth hormone and fish immune system. *Gen. Comp. Endocrinol.* 152, 353–8. doi:10.1016/j.ygcen.2007.01.045
- Yada, T., 2009. Effects of insulin-like growth factor-I on non-specific immune functions in rainbow trout. *Zoolog. Sci.* 26, 338–43. doi:10.2108/zsj.26.338
- Yada, T., Azuma, T., 2002. Hypophysectomy depresses immune functions in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 131, 93–100.
- Zhang, X., Ho, S.-M., 2010. Epigenetics meets endocrinology. *J. Mol. Endocrinol.* 46, R11–R32. doi:10.1677/JME-10-0053
- Zhu, J., Paul, W.E., 2008. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 112, 1557–69. doi:10.1182/blood-2008-05-078154
- Zhu, T., Goh, E.L., Graichen, R., Ling, L., Lobie, P.E., 2001. Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.* 13, 599–616.