PATRÍCIA COUTINHO DE SOUZA

Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea)

**SÃO PAULO
2010**

PATRÍCIA COUTINHO DE SOUZA

Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

**São Paulo
2010**

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2225
FMVZ

Souza, Patrícia Coutinho de

Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea) / Patrícia Coutinho de Souza. -- 2009.

108 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias.

1. Citocinas. 2. Proteína S-100. 3. Lisozima. 4. Depleção linfóide.
5. *Pontoporia blainvillei*. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise dos aspectos imunopatológicos das pneumopatias de *Pontoporia blainvillei* e *Sotalia guianensis*", protocolado sob o nº1299/2008, utilizando 30 (trinta) animais de cada espécie (toninha/boto cinza), sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 20 de fevereiro de 2008.

We certify that the Research "Analysis of immunopathological aspects of pneumopathy of *Pontoporia blainvillei* and *Sotalia guianensis*", protocol number 1299/2008, under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 02/20/08.

São Paulo, 18 de fevereiro de 2008

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

Nome: SOUZA, Patrícia Coutinho de

TÍTULO: Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares que sempre me deram amor e força, valorizando meus potenciais.

À Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por ter me acolhido como aluna no Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, possibilitando minha titulação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de mestrado (Processo nº. 2007/56801-0).

Ao Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias, por me receber e pelos ensinamentos que em muito enriqueceram meu aprendizado.

À Carla Pagliari, um particular reconhecimento é devido ao carinho, atenção, constante encorajamento, pela hospitalidade, empenho que colocou neste trabalho e auxílio que permitiram a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Andreas Beineke agradeço pela incrível atenção e paciência.

À Profa. Irma Seixas Duarte, pela contribuição ao delineamento desta dissertação.

À Profa. Ises de Almeida Abrahamsohn, pela disponibilização de importantes ferramentas para a conclusão deste trabalho.

À Elaine Raniero, pela amizade sincera e apoio na realização deste trabalho.

Um agradecimento super especial à Elza Faquim da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela atenção, paciência e dedicação durante a formatação deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis pelos valiosos ensinamentos, paciência e dedicação na realização desta dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da USP, pela paciência, amizade ajuda e disponibilidade nos momentos em que precisei durante a execução deste trabalho.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, pela convivência e amizade.

À Valéria Ruoppolo e Juliana Marigo pelo carinho e apoio.

RESUMO

SOUZA, P. C. **Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea).** [Pulmonary and splenic immunoexpression of IL-12, TGF- β and TNF- α cytokines and S-100 and Lysozyme proteins in *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea)]. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Compreender a função das diferentes proteínas e citocinas durante a vigência de alterações inflamatórias pode contribuir para um melhor conhecimento do sistema imunológico dos mamíferos marinhos e sua relação com os processos patológicos.

A toninha, *Pontoporia blainvillei*, é um cetáceo costeiro e o único golfinho brasileiro considerado ameaçado de extinção devido às atividades antrópicas. O objetivo desse trabalho foi avaliar as imunoexpressões das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e proteínas S-100 e lisozima em amostras pulmonares e esplênicas de 34 espécimes de *P. blainvillei*. Com base nas alterações histopatológicas, os animais foram divididos em dois grupos: G1 (n = 8) - animais sem doença inflamatória pulmonar; G2 (n = 26) - animais com doenças inflamatórias pulmonares. Os fragmentos de pulmão e baço foram processados de acordo com os protocolos de rotina. A padronização das reações de imuno-histoquímica e análise morfométrica foram realizadas conforme procedimentos descritos na literatura. Os nossos dados demonstram que as *P. blainvillei* pertencentes ao G2 apresentam imunoexpressão pulmonar das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e proteínas S-100 e lisozima significativamente maior que os animais do G1. Tais resultados corroboram os dados disponíveis na literatura, indicando que a *P. blainvillei* apresenta citocinas com funções semelhantes às encontradas em outros mamíferos. Evidenciamos também, que as *P. blainvillei* pertencentes ao G2 não apresentam imunoexpressão esplênica das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e da proteína lisozima significativamente maior que os animais do G1. Estudos mais detalhados, incluindo aqueles relacionados com os métodos utilizados, são necessários para a adequada compreensão destes resultados. E finalmente, apesar de tratar-se de dados ainda preliminares, observou-se uma possível associação entre elevadas concentrações de organoclorados no tecido adiposo subcutâneo de parcela dos exemplares de *P. blainvillei* estudados na presente investigação e a ocorrência de depleção linfóide esplênica nestes animais. Tais dados ratificam a importância do desenvolvimento de análise mais detalhada sobre estes tópicos em futuras investigações científicas.

Palavras-chave: Citocinas. Proteína S-100. Lisozima. Depleção linfóide. *Pontoporia blainvillei*.

ABSTRACT

SOUZA, P. C. **Pulmonary and splenic immunoexpression of IL-12, TGF- β and TNF- α cytokines and S-100 and Lysozyme proteins in *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844) (Mammalia, Cetacea).** [Imunoexpressões pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TGF- β e TNF- α e das proteínas Lisozima e S-100 em *Pontoporia blainvillei* (Gervais e d'Orbigny, 1844)]. 2010. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The understanding of the role of different proteins and cytokines during the inflammatory diseases could lead to better knowledge of the marine mammal immune system and its relation to pathological process. Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*, is a coastal cetacean and the only Brazilian dolphin considered threatened with extinction, due to the human activities. The aim of the current study was to investigate the immunoexpression of TGF- β , TNF- α and IL-12 cytokines, and S-100 and Lysozyme proteins in pulmonary and splenic samples of 34 *Pontoporia blainvillei*. Based on histopathological examination, the animals were divided in two groups: G1 (n = 8) – animals without pulmonary inflammatory disease; G2 (n = 26) – animals with pulmonary inflammatory diseases. Fragments of lung and spleen were processed according to routine protocols. The immunohistochemistry and morphometric procedures were tested and optimized according to proceedings described in literature. Our results showed that *P. blainvillei* from G2 presented significant increase in the pulmonary immunoexpression of TGF- β , TNF- α and IL-12 cytokines, and S-100 and Lysozyme proteins in comparison with animals from G1. These results are according to the literature and suggest that *P. blainvillei* presents same cytokines observed in other mammals. We evidenced also that the *P. blainvillei* belonging to the G2 did not show splenic immunoexpression to TGF- β , TNF- α and IL-12 cytokines and Lysozyme protein significantly higher than animals from G1. Further studies, including those related to the methods used, are necessary for the proper understanding of these results. And finally, although these are still preliminary data, we observed a possible association between high concentrations of organochlorines in subcutaneous adipose tissue of a portion of *P. blainvillei* studied in this research and the occurrence of splenic lymphoid depletion in these animals. These data confirm the importance of developing more detailed analysis on these topics in future scientific investigations.

Keywords: Cytokines, S-100 Protein, Lysozyme, Lymphoid depletion, *Pontoporia blainvillei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Cetáceo da espécie <i>Pontoporia blainvillei</i> (Adaptado de http://latin.wdcs.org).....	23
Figura 2 -	Distribuição geográfica (destacada em verde) da espécie <i>Pontoporia blainvillei</i> , se estendendo desde o Golfo Nuevo (42° 35'S), Patagônia, Argentina até Itaúnas (18° 25'S), Espírito Santo, Brasil (Adaptado de Danilewicz et al., 2004).....	23
Figura 3 -	Esquema anatômico do Sistema Respiratório superior de cetáceos. Observar a relação existente entre esôfago e traquéia. (Adaptado de ROMMEL et al., 2006).....	29
Figura 4 -	Esquema histológico do Sistema Respiratório inferior de cetáceos. Observar a cartilagem associada às vias aéreas terminais e esfíncter mioelástico circundando os bronquíolos distais. (Adaptado de ROMMEL et al., 2006).....	30
Figura 5 -	Fotomicrografia de baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> . AC: Arteriola central; PALS: Bainha linfóide periarteriolar; PV: Polpa vermelha; T: Tecido elástico fibrolemiocítico; ZM: Zona marginal. Caso BP 152. HE, 100.....	32
Figura 6 -	Exemplar de cetáceo da espécie <i>Pontoporia blainvillei</i> . Caso BP 160.....	60
Figura 7 -	Pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar congestão e edema intensos, associados à marcante distensão parenquimatosa evidenciado pela visualização do gradil costal. Pneumonia intersticial. Caso BP 155.....	60
Figura 8 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar congestão e edema intensos (Seta). Caso MOCA 203. HE, 100x.....	62
Figura 9 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> acometida por Broncopneumonia. Observar marcante infiltrado inflamatório misto alveolar (Seta) associado à congestão e edema intensos. Caso BP 12. HE, 200x.....	62
Figura 10 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> acometido por Braoncopneumonia. Observar infiltrado inflamatório alveolar misto moderado (Seta) associado à congestão intensa. Caso PA 132. HE, 200x.....	62
Figura 11 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar a presença de cristais de colesterol (Seta) envoltos por infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear associado à presença de células gigantes multinucleadas. Pneumonia granulomatosa por corpo estranho. Caso BP 31. HE, 200x.....	62

- Figura 12 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 64
- Figura 13 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 64
- Figura 14 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 64
- Figura 15 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP12. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 64
- Figura 16 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 213. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 66
- Figura 17 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso IPEC 095. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 66

- Figura 18 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 213. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 66
- Figura 19 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso IPEC 095. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 66
- Figura 20 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF-β (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 67
- Figura 21 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF-β (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 67
- Figura 22 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF-β (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 67
- Figura 23 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF-β (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×..... 67

Figura 24 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 204. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	70
Figura 25 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	70
Figura 26 -	Fotomicrografia de baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 204. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	70
Figura 27 -	Fotomicrografia de baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	70
Figura 28 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 209. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	72
Figura 29 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma [®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	72

Figura 30 -	Fotomicrografia de pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	72
Figura 31 -	Fotomicrografia de baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> . Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 209. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400x.....	72
Figura 32 -	Fotomicrografia de baço normal (Grau I = Área média da polpa branca $\geq 200,000 \mu\text{m}^2$) de <i>Pontoporia blainvillei</i> , correspondente ao Caso BP 152, com área média efetiva de polpa branca de $200.056 \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100x.....	74
Figura 33 -	Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau II = Área média da polpa branca $> 100,000\text{--}200,000 \mu\text{m}^2$) de <i>Pontoporia blainvillei</i> , correspondente ao Caso BP 56, com área média efetiva de polpa branca de $148.397,4 \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100x.....	74
Figura 34 -	Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau III = Área média da polpa branca $> 50,000\text{--}100,000 \mu\text{m}^2$) de <i>Pontoporia blainvillei</i> , correspondente ao Caso BP 160, com área média efetiva de polpa branca de $68.334,2 \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100x.....	76
Figura 35 -	Figura 35 - Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau IV = Área média da polpa branca $> 50,000\mu\text{m}^2$) de <i>Pontoporia blainvillei</i> , correspondente ao Caso BP 161, com área média efetiva de polpa branca de $42.938,1\mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100x.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Distribuição dos anticorpos testados para padronização das reações imuno-histoquímicas em baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> , em função da especificidade, fabricante, clone, isotipo, espécie de origem e espécie alvo - São Paulo - 2008.....	39
Tabela 2 -	Distribuição dos anticorpos testados para a padronização das reações imuno-histoquímicas em baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> , em função da especificidade, fabricante, exposição antigênica, sistema de detecção e diluição - São Paulo - 2008.....	40
Tabela 3 -	Distribuição dos diagnósticos morfológicos principais observados no pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> pertencentes ao Grupo 1 (N = 8), em função do número do tombo, sexo e faixa etária - São Paulo - 2008.....	48
Tabela 4 -	Distribuição dos diagnósticos morfológicos principais observados no pulmão de <i>Pontoporia blainvillei</i> pertencentes ao Grupo 2 (N = 26), em função do número do tombo, sexo e faixa etária - São Paulo - 2008.....	49
Tabela 5 -	Distribuição dos resultados obtidos durante a padronização das reações imuno-histoquímica realizadas no baço de <i>Pontoporia blainvillei</i> , em função da especificidade, fabricante, clone e diluição - São Paulo - 2008.....	51
Tabela 6 -	Análise morfométrica da imunoexpressão pulmonar das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em células marcadas/mm ² de tecido pulmonar - São Paulo - 2009.....	52
Tabela 7 -	Análise morfométrica da imunoexpressão pulmonar das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em células marcadas/mm ² de tecido pulmonar - São Paulo - 2009.....	52
Tabela 8 -	Análise morfométrica da imunoexpressão esplênica das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em células marcadas/mm ² de tecido esplênico - São Paulo - 2009.....	53

Tabela 9 -	Análise morfométrica da imunoexpressão esplênica das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em células marcadas/mm ² de tecido esplênico - São Paulo - 2009.....	54
Tabela 10 -	Áreas de polpa branca de <i>Pontoporia blainvillei</i> sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em μm^2 - São Paulo - 2009.....	55
Tabela 11 -	Áreas de polpa branca de <i>Pontoporia blainvillei</i> com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em μm^2 - São Paulo - 2009.....	55
Tabela 12 -	Distribuição da intensidade da depleção linfóide esplênica em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem alteração inflamatória pulmonar (Grupo 1; n = 8) em função do sexo e faixa etária - São Paulo - 2009.....	57
Tabela 13 -	Distribuição da intensidade da depleção linfóide esplênica em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem alteração inflamatória pulmonar (Grupo 2; n = 26) em função do sexo e faixa etária - São Paulo - 2009.....	58
Tabela 14 -	Porcentagem de homologia entre as sequências dos ácidos nucleicos das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α) do boto-do-porto (<i>Phocoena phocoena</i>) com as sequências de cDNA de outras espécies de mamíferos. Resultados demonstrados em porcentagem (Adaptado de Beineke et al., 2004).....	80
Tabela 15 -	Avaliação morfométrica para imunoexpressão pulmonar das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem (Grupo 1/Controle) e com (Grupo 2) alterações inflamatórias.....	81
Tabela 16 -	Avaliação morfométrica para imunoexpressão esplênica das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em <i>Pontoporia blainvillei</i> sem (Grupo 1/Controle) e com (Grupo 2) alterações inflamatórias pulmonares.....	81
Tabela 17 -	Distribuição das concentrações médias de pesticidas organoclorados em <i>Pontoporia blainvillei</i> , de acordo com o sexo, faixa etária e intensidade de depleção linfóide esplênica. Resultados expressos em ng.g ⁻¹ lipídios.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição da faixa etária dos 34 casos de <i>Pontoporia blainvillei</i> mantidos pelo Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos - LAPCOM - e selecionados para o desenvolvimento do projeto - São Paulo - 2008.....	47
Gráfico 2 -	Distribuição da intensidade de depleção linfóide esplênica de <i>Pontoporia blainvillei</i> sem (Grupo 1; n = 8) e com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26) - São Paulo - 2009.....	56

NOMES POPULARES E LISTA DE ESPÉCIES

Baleia-beluga	<i>Delphinapterus leucas</i>
Baleia-bicuda-de-Baird	<i>Berardius bairdii</i>
Baleia-piloto	<i>Globicephala macrorhynchus</i>
Boto-cinza	<i>Sotalia guianensis</i>
Boto-do-porto	<i>Phocoena phocoena</i>
Golfinho-comum	<i>Delphinus delphis</i>
Golfinho-de-laterais-brancas-do-Pacífico	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>
Golfinho-de-Risso	<i>Grampus griseus</i>
Golfinho-nariz-de-garrafa	<i>Tursiops truncatus</i>
Golfinho-pintado-tropical	<i>Stenella attenuata</i>
Golfinho-riscado	<i>Stenella coeruleoalba</i>
Toninha	<i>Pontoporia blainvillei</i>

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AQT	Análise quantitativa
BSA	Soro-albumina-bovina
Con-A	Concanavalina-A
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
DAB	Diaminobenzidina
DDE	Dicloro difenil dicloroetileno
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
FGF	Fatores de crescimento do fibroblasto
G1	Grupo 1
G2	Grupo 2
IFN- γ	Interferon-gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeos
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
pAc	Anticorpo policlonal
PALS	Bainha linfóide periarteriolar
PBDE	Bidifenil éteres polibromados
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Solução <i>phosphate buffer saline</i>
PCB	Bifenil policlorados
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
PWM	Mitógeno " <i>pokeweed</i> "
rh IL-2	IL-2 humana recombinante
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real
SABC	Estreptavidina-biotina-peroxidase
TGF- β	Fator transformante de crescimento-beta
Th1	Células T <i>helper</i> 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	21
2.1	Objetivos gerais.....	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1	Mamíferos marinhos.....	22
3.1.1	Toninha (<i>Pontoporia blainvillei</i>).....	22
3.2	Pesquisas associadas à resposta imune dos mamíferos marinhos.....	24
3.3	Morfologia do sistema respiratório de cetáceos.....	29
3.4	Morfologia do baço de cetáceos.....	30
3.4.1	Baço.....	31
3.5	Citocinas.....	32
3.5.1	TGF- β	33
3.5.2	TNF- α	33
3.5.4	IL-12.....	34
3.6	Lisozima.....	35
3.7	Proteínas da família S-100.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Animais e Material selecionado.....	37
4.2	Análise Histopatológica.....	37
4.3	Padronização das reações imuno-histoquímicas.....	38
4.3.1	Imunofenotipagem das células inflamatórias de <i>P. blainvillei</i>	41
4.3.2	Imunomarcagem das citocinas de <i>P. blainvillei</i>	43
4.4	Análise quantitativa da expressão pulmonar das proteínas S-100 e lisozima, e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em <i>P. blainvillei</i> , acometida ou não de processo inflamatório pulmonar.....	44
4.5	Análise quantitativa da expressão esplênica das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF-beta, IL-12 e TNF-alfa em <i>P. blainvillei</i> acometida ou não de processo inflamatório pulmonar.....	44
4.6	Análise do grau de depleção esplênica de <i>P. blainvillei</i>	45
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS.....	47
6.1	Animais.....	47
6.2	Análise histopatológica.....	48
6.3	Padronização das Reações Imuno-histoquímicas.....	50
6.4	Análise quantitativa da expressão pulmonar das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em <i>P. blainvillei</i>	52

6.5	Análise quantitativa das expressões esplênicas das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em <i>P. blainvillei</i>	53
6.6	Análise do grau de depleção esplênica.....	54
7	DISCUSSÃO.....	77
7.1	Imunofenotipagem das células linfóides.....	77
7.2	Imunoexpressão das citocinas.....	78
7.2.1	Imunoexpressões pulmonar e esplênica do TGF- β em <i>P. blainvillei</i>	81
7.2.2	Imunoexpressões pulmonar e esplênica do TNF- α em <i>P. blainvillei</i>	82
7.2.3	Imunoexpressão pulmonar e esplênica da IL-12 em <i>P. blainvillei</i>	83
7.3	Imunoexpressão pulmonar e esplênica da lisozima em <i>P. blainvillei</i>	85
7.4	Imunoexpressão pulmonar e esplênica das proteínas da família S100 em <i>P. blainvillei</i>	86
7.5	Avaliação do grau de depleção linfóide esplênica em <i>P. blainvillei</i>	87
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
9	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	ANEXO A.....	105
	APÊNDICE A.....	108

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente 8.000 km de costa. Neste vasto litoral, já foram notificadas cinquenta espécies de mamíferos aquáticos em águas continentais e costeiras (IUCN, 1991; PINEDO et al., 1992; IBAMA, 2001).

As pesquisas com mamíferos marinhos são recentes no Brasil, sendo que diversas enfermidades causadas por bactérias, vírus, fungos e endoparasitas têm sido identificadas e estudadas nestes animais (RUOPPOLO, 2003), principalmente as associadas à Ordem *Cetacea* (do latim, *cetus* = baleia), representada pelas baleias e golfinhos (PINEDO et al., 1992).

Paralelamente, sabe-se também que a incidência das doenças infecciosas nos mamíferos marinhos, incluindo as parasitárias, pode ser aumentada em decorrência de imunossupressão (BEINEKE et al., 2004).

Entretanto, com base nas informações disponíveis até o presente momento na literatura mundial sobre o sistema imune dos mamíferos marinhos, observa-se que este ainda é pouco estudado (STOSKOPF, 1990; SHOJI et al., 2001; BEINEKE et al., 2004; BEINEKE et al., 2009).

Desta forma, o trabalho ora proposto, envolvendo as áreas da Patologia, Histologia e Imunologia, visou a obtenção de dados sobre a resposta imunopatológica de uma espécie de mamífero marinho, denominada Toninha (*Pontoporia blainvillei*), frente aos processos inflamatórios pulmonares.

Espera-se que estes resultados possam contribuir para a compreensão dos fenômenos patológicos que acometem tal espécie de cetáceo, contribuindo para o corpo de conhecimento existente sobre a patologia comparada de mamíferos marinhos e paralelamente, auxiliar na conservação destes animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar aspectos imunopatológicos de pneumopatias em *P. blainvillei*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quantitativamente, através de ferramentas morfométricas e técnicas imuno-histoquímicas, a participação das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas IL-12, TNF- α e TGF- β no pulmão de *P. blainvillei*, acometidos ou não por processos inflamatórios pulmonares.
- Caracterizar quantitativamente, através de ferramentas morfométricas e técnicas imuno-histoquímicas, a presença das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas IL-12, TNF- α , e TGF- β no baço de *P. blainvillei*, acometidos ou não por processos inflamatórios pulmonares.
- Caracterizar quantitativamente, através de ferramentas morfométricas o grau de depleção linfóide esplênica de *P. blainvillei*, acometidos ou não por processos inflamatórios pulmonares.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mamíferos marinhos

Os mamíferos marinhos constituem um grupo com aproximadamente 120 espécies e estão divididos em 3 grandes ordens: Cetacea, Carnivora e Sirenia.

A Ordem Cetacea é constituída por 79 espécies (JEFFERSON et al., 1993), representada por animais totalmente adaptados à vida aquática, sendo composta pelas baleias e golfinhos (PINEDO et al., 1992). Deve-se ressaltar que já foi reportada a ocorrência de 45 espécies de cetáceos em águas brasileiras, correspondendo a 57% das conhecidas mundialmente (IBAMA, 2003).

Os cetáceos estão divididos em 2 subordens: Mysticeti e Odontoceti (LEATHERWOOD; REEVES; 1982; JEFFERSON et al.; 1993).

A Subordem Mysticeti inclui 12 espécies de baleias verdadeiras (ENGEL; MARCONDES, 2005), que apresentam como características principais as barbatanas e dois orifícios respiratórios.

Por outro lado, a Subordem Odontoceti engloba todos os cetáceos possuidores de dentes ao invés de barbatanas. É composta por cerca de 70 espécies de golfinhos em geral, incluindo as orcas, os cachalotes e a Toninha (*Pontoporia blainvillei*) (NORBERTO et al., 2005), que constitui a espécie-alvo deste trabalho.

3.1.1 Toninha (*Pontoporia blainvillei*)

A Toninha ou Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) (Figura 1) é um pequeno cetáceo endêmico da região oeste do oceano Atlântico Sul, cuja distribuição estende-se ao longo de águas costeiras desde o Golfo Nuevo (42° 35'S), Patagônia, Argentina (CRESPO; HARRIS, 1992), até Itaúnas (18° 25'S), Espírito Santo, Brasil (MOREIRA; SICILIANO, 1991) (Figura 2).

Figura 1 – Cetáceo da espécie *Pontoporia blainvillei* (Adaptado de <http://latin.wdcs.org>)

Figura 2 - Distribuição geográfica (destacada em verde) da espécie *Pontoporia blainvillei*, se estendendo desde o Golfo Nuevo (42° 35'S), Patagônia, Argentina até Itaúnas (18° 25'S), Espírito Santo, Brasil (Adaptado de Danilewicz et al., 2004)

A distribuição da *P. blainvillei* parece estar fragmentada ao longo da costa brasileira, ocorrendo entre Ubatuba, SP (23°20'S) e Macaé, RJ (22°25'S) e entre Barra de Itabapoana, ES (21°18'S) e Regência, ES (19°40'S). Esta distribuição pode ser consequente à descarga de água doce dos rios Paraíba e Doce, à estreita

plataforma continental ou devido à presença freqüente de predadores, incluindo tubarões e orcas (*Orcinus orca*) (SICILIANO et al., 2002).

A captura acidental em redes de pesca é o principal problema para a conservação da *P. blainvillei*. A mortalidade decorrente dos emalhes em redes ocorre ao longo de praticamente toda distribuição geográfica da espécie na costa atlântica da América do Sul (BERTOZZI; ZERBINI, 2002; ROSAS et al., 2002; NETTO; BARBOSA, 2003). Recentes evidências sugerem que as taxas de mortalidade sejam excessivas e insustentáveis (CRESPO et al., 1998; SECCHI et al., 2002).

A *P. blainvillei* é o cetáceo mais impactado da costa leste da América do Sul, constando na lista de espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção (IBAMA, 2003). A espécie também está listada na categoria “*Dados Deficientes*” no Livro Vermelho da União Mundial para a Conservação da Natureza (IUCN, 2007) e encontra-se ainda listada no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Silvestres Ameaçadas de Extinção (CITES), da qual a Argentina, Uruguai e Brasil são signatários.

Além do mais, durante o último Plano de Ação para Cetáceos da IUCN/ *Species Survival Commission Cetacean Specialist Group* (2004-2010), a *P. blainvillei* foi considerada uma espécie que necessita de medidas particulares de conservação devido a sua distribuição costeira restrita e a sua alta vulnerabilidade à captura acidental em redes de pesca (REEVES et al., 2003).

3.2 Pesquisas associadas à resposta imune dos mamíferos marinhos

Sabe-se que têm crescido significativamente o interesse e o incentivo para o estudo dos mamíferos marinhos no Brasil. Tais estudos são importantes não só para o conhecimento das causas de mortalidade natural, mas também são ferramentas para identificação de estoques ecológicos, principalmente de espécies pouco conhecidas e com dados insuficientes sobre sua biologia, como ocorre com várias espécies de cetáceos e pinípedes no país (IBAMA, 2001).

Com base em pesquisas recentes desenvolvidas no Laboratório de Patologia

Comparada de Animais Selvagens – LAPCOM – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ/USP, observou-se que o sistema respiratório está associado a aproximadamente 89% das causas de morte dos cetáceos pesquisados (RUOPPOLO, 2003).

Paralelamente, sabe-se também que as infecções parasitárias são achados comuns nos mamíferos marinhos de vida livre. Em vários casos, as parasitoses estão listadas entre as causas de encalhe e morte dos animais, e a patogenicidade destes processos depende de fatores que incluem a localização e grau de infecção do hospedeiro, estado geral e nutrição do mesmo, assim como possíveis efeitos químicos, físicos ou imunológicos, endógenos ou exógenos, causados pela presença do parasita (HOWARD et al., 1983; MARIGO, 2003; MARIGO et al., 2010).

Os parasitos pulmonares são considerados uma das principais causas de mortalidade em populações de cetáceos, devido aos efeitos diretos das pneumonias parasitárias, ou por complicações secundárias, tais como processos bacterianos, complicações cardiovasculares e reações de hipersensibilidade ao parasita (JEPSON et al., 2000).

Em seu estudo, Marigo (2003) demonstra que os parasitas pulmonares foram macroscopicamente observados em 30,7% dos cetáceos analisados; porém, exames histopatológicos mostraram que 62,5% dos animais apresentavam lesões relacionadas a estes agentes infecciosos. Neste trabalho, os botos cinza (*Sotalia guianensis*) apresentaram uma prevalência de 100% do nematóide *Halocercus brasiliensis* nos pulmões dos animais provenientes de São Paulo e 86,7% nos animais do Paraná. Por outro lado, nos animais da espécie *P. blainvillei* não foram observados parasitas pulmonares, sugerindo desta forma, que nestes animais os parasitas possuem uma estreita relação com a espécie hospedeira e, mesmo abundantes no ambiente, não são compatíveis com esta última espécie.

Sabe-se também que a incidência das doenças infecciosas nos mamíferos marinhos, incluindo as infecções parasitárias, pode aumentar em decorrência de imunossupressão (BEINEKE et al., 2004).

MARIGO, J.; RUOPPOLO, V.; ROSAS, F.C.W.; VALENTE, A.L.S.; OLIVEIRA, M.R.; DIAS, R.A.; CATÃO-DIAS, J.L. Helminths of *Sotalia Guianensis* (CETACEA, DELPHINIDAE), in the South and Southeastern coasts of Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, 2010. No prelo.

Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas, visando maior conhecimento da resposta imune dos mamíferos marinhos. Dentre estes estudos, estão incluídas a avaliação da fagocitose, do *burst* oxidativo, a mensuração da transformação linfoblástica induzida por mitógenos, assim como da atividade das células *Natural Killer* (NK). Além do mais, a investigação da resposta imune humoral e expressão de citocinas também têm sido realizadas em mamíferos marinhos.

Guise et al. (1995) estudaram a fagocitose e o *burst* oxidativo em baleias beluga (*Delphinapterus leucas*). Sabe-se que estes processos correspondem às duas principais funções dos neutrófilos e estão dentre os mais importantes dos mecanismos de defesa não específicos. O estudo demonstrou que a fagocitose foi estatisticamente maior em fêmeas do que em machos, enquanto o *burst* oxidativo foi significativamente menor nas fêmeas, quando comparadas aos machos.

O mesmo grupo de pesquisa também mensurou a transformação linfoblástica induzida por mitógenos em cetáceos (GUISE et al., 1996), uma vez que esta técnica possibilita as avaliações quantitativa e qualitativa da resposta imune celular antígeno específica e não específica. Neste trabalho, Guise et al. (1996) utilizaram quatro diferentes mitógenos [Concanavalina-A (Con-A), Fitohemaglutinina (PHA), Lipopolissacarídeos (LPS) e mitógeno “pokeweed” (PWM)] em associação com a IL-2 humana recombinante (rh IL-2). Primeiramente observou-se que a Con-A, PHA e PWM, mas não o LPS, estimularam as células T em *D. leucas*, sendo semelhante ao observado em outras espécies. Em adição, o 2-mercaptoetanol não elevou significativamente a proliferação das células estimuladas pela Con-A, PHA e LPS. Por outro lado, isto foi observado nas células estimuladas por PWM e nas culturas celulares sem a presença dos mitógenos.

Guise et al. (1997) também avaliaram a atividade das células NK em *D. leucas*, uma vez que essas células correspondem a um importante mecanismo de defesa contra as infecções virais e os tumores. Os estudos foram realizados com a utilização da citometria de fluxo e marcação radioativa pelo ^{51}Cr . Nesta pesquisa, a citotoxicidade das células NK foi demonstrada em duas linhagens celulares NK-sensíveis (YAC-1, uma linhagem celular do linfoma murino, e a K-562, uma linhagem celular da eritroleucemia humana). Estas linhagens foram previamente marcadas radioativamente pelo ^{51}Cr , e posteriormente incubadas com células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de *D. leucas*. Os pesquisadores observaram um

discreto aumento na taxa de liberação do ^{51}Cr das células alvo, após 6 horas da incubação da PBMC. Porém, após 18 horas observou-se um intenso aumento na atividade citotóxica das células NK avaliadas, caracterizado pela elevação significativa da liberação do ^{51}Cr . Segundo os autores, estes dados podem contribuir para um melhor entendimento dos eventos associados à alta prevalência de neoplasias nesta espécie.

Para investigar a resposta imune humoral dos mamíferos marinhos, as imunoglobulinas (Ig) A, IgG e IgM, assim como subclasses da IgG de diferentes espécies dos cetáceos, foram purificadas e identificadas no plasma destes animais (NASH; MACH, 1971; TRAVIS; SANDERS, 1972; ANDRESDOTTIR et al., 1987). Além do mais, os cDNA das cadeias pesadas da IgA, IgG e IgM de golfinhos-nariz-de-garrafa (*Tursiops truncatus*) foram sequenciados (LUNDQVIST et al., 2002; MANCIA et al., 2006; MANCIA et al., 2007b).

Kawashima et al. (2004a) padronizaram e avaliaram a reação cruzada de quatro anticorpos humanos (anti-SRA-E5, anti-AM-3K, anti-EBM11 e anti-Lisozima) em golfinhos-de-Risso (*Grampus griseus*) e baleias-piloto (*Globicephala macrorhynchus*). Estes marcadores permitem a identificação dos macrófagos residentes em baço, linfonodos, fígado, pulmões, rins, intestino e pele.

Em 2005, Beineke et al. avaliaram a correlação entre o grau de depleção dos tecidos linfóides e a condição sanitária dos animais, uma vez que alterações no timo e baço podem ser induzidas primariamente por poluentes ou ser conseqüentes às doenças infecciosas. Segundo os autores, os botos-do-porto (*Phocoena phocoena*) provenientes dos mares do Norte e Báltico apresentam maior incidência de infecções bacterianas quando comparadas aos botos originários do Ártico. Desta forma, neste estudo realizou-se a análise das concentrações de PCBs (Bifenil policlorados), PBDEs (Bidifenil éteres polibromados), DDT (Dicloro difenil tricloroetano) e DDE (Dicloro difenil dicloroetileno) associadas à avaliação histopatológica dos órgãos linfóides de 61 *P. phocoena* encalhadas no mar do Norte, mar Báltico e litorais da Islândia e Noruega. As atrofia tímica e esplênica foram correlacionadas positivamente com a elevação dos níveis de PCBs e PBDEs. No entanto, a depleção linfóide também foi associada à redução do peso dos animais e condição sanitária ruim. Neste caso, os autores sugerem a hipótese da ocorrência de uma imunossupressão contamine-induzida, possivelmente contribuindo para o

aumento da susceptibilidade às doenças em *P. phocoena*.

Mais recentemente, foram realizadas algumas pesquisas direcionadas à expressão de citocinas em mamíferos marinhos, já que a quantificação da expressão destas proteínas permite a avaliação da funcionalidade dos leucócitos e caracterização das respostas inflamatórias.

Baseado nestas premissas, Beineke et al. (2007a), investigaram a expressão de algumas citocinas em cetáceos, incluindo a IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α e TGF- β .

O objetivo principal deste estudo foi analisar quantitativamente, valendo da técnica do RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – Tempo Real), as alterações nos níveis do mRNA de citocinas nos animais da espécie *P. phocoena* com condições sanitárias classificadas como boa ou ruim. Uma significativa regulação positiva (*up-regulation*) da IL-10 foi encontrada predominantemente nos indivíduos com condição sanitária ruim e com evidência de infecções bacterianas crônicas. As demais citocinas não mostraram correlações positivas, seja com a condição sanitária do animal, seja com a depleção linfóide observada. Cumpre salientar que as sequências dos nucleotídeos dos aminoácidos das citocinas pró e anti-inflamatórias dos mamíferos marinhos utilizadas estão listadas no “*Gene Bank*” do Centro Nacional para Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov).

Ainda, as análises toxicológicas deste mesmo estudo revelaram uma correlação positiva entre as elevadas concentrações corporais de contaminantes ambientais, como o PCB e o PBDE, e as depleções linfóides tímica e esplênica nos animais pesquisados.

Apesar dos esforços atuais associados à imunologia dos mamíferos marinhos, diversos aspectos da função imunitária em mamíferos aquáticos permanecem desconhecidos (STOSKOPF, 1990; SHOJI et al., 2001; BEINEKE et al., 2004), especialmente a resposta imune mediada pelas citocinas (BEINEKE et al., 2007a).

Sendo assim, deve-se ressaltar a importância de haver maior conhecimento sobre a expressão das citocinas nestas espécies, uma vez que estas desenvolvem importante função no recrutamento, proliferação e sobrevivência das células inflamatórias nas enfermidades pulmonares (MURO et al., 2001).

Assim como as citocinas, proteínas da família S100 e a lisozima são pouco

estudadas nos mamíferos marinhos e também requerem maior conhecimento, uma vez que as proteínas da família S100 estão relacionadas a diversas atividades das células inflamatórias (DONATO, 2001), e a lisozima é o polipeptídeo mais abundante nas secreções do trato respiratório de mamíferos (GANZ, 2002).

3.3 Morfologia do sistema respiratório de cetáceos

A estrutura e fisiologia do sistema respiratório dos cetáceos merecem particular atenção, uma vez que estes animais apresentam especializações morfológicas associadas à vida aquática (PABST et al., 1999). Estas particularidades envolvem o espiráculo, os espaços aéreos da cabeça e as vias aéreas terminais dos pulmões.

Primeiramente, deve-se ressaltar que um único espiráculo, também denominado de orifício respiratório, é encontrado no topo da cabeça dos odontocetos (ROMMEL et al., 2006). O vestíbulo do espiráculo possui uma série de sacos aéreos associados, que estão envolvidos na produção de som. A anatomia do vestíbulo do espiráculo e de seus sacos aéreos varia entre as espécies de odontocetos (MEAD, 1975).

A laringe dos cetáceos é uma estrutura extremamente modificada quando comparada aos demais mamíferos, apresentando morfologia tubular e alongada, que permite a comunicação da traquéia com o espiráculo (Figura 3). Esta alteração anatômica separa efetivamente os sistemas digestivo e respiratório (ROMMEL; LOWENSTEIN, 2001).

Figura 3 – Esquema anatômico do Sistema Respiratório superior de cetáceos. Observar a relação existente entre esôfago e traquéia. (Adaptado de ROMMEL et al., 2006)

Os pulmões dos cetáceos não são lobulados e apresentam pleura espessa (ROMMEL; LOWENSTINE, 2001).

As vias aéreas terminais dos cetáceos são reforçadas por uma cartilagem que se estende até os alvéolos (Figura 4) e que previne o colapso destas quando submetidas à pressão durante os mergulhos (ROMMEL; LOWENSTINE, 2001).

Adicionalmente, esfíncteres mioelásticos são encontrados nos bronquíolos terminais, possivelmente sendo outra adaptação para o mergulho dos animais (ROMMEL; LOWENSTINE, 2001).

Figura 4 – Esquema histológico do Sistema Respiratório inferior de cetáceos. Observar a cartilagem associada às vias aéreas terminais e esfíncter mioelástico circundando os bronquíolos distais. (Adaptado de ROMMEL et al., 2006)

3.4 Morfologia do baço de cetáceos

O conhecimento da anatomia dos órgãos linfóides dos cetáceos é essencial para interpretar as alterações observadas à necropsia, especialmente para discriminar os achados anatopatológicos das alterações fisiológicas atribuídas à maturidade destes animais (BEINEKE et al., 2009).

Os órgãos linfóides primários e secundários de baleias e golfinhos exibem similaridades com as demais espécies de mamíferos (BEINEKE et al., 2009).

3.4.1 Baço

O baço dos cetáceos é um órgão único. Mas, diferentemente de outras espécies, múltiplos baços acessórios são frequentemente visualizados em baleias e golfinhos (NAKAMINE et al., 1992; COWAN; SMITH, 1999).

Além de sua função associada à resposta imune, o baço dos *T. truncatus* e *P. phocoena* está envolvido na hematopoiese extramedular, como observado em outros mamíferos, especialmente os jovens (COWAN; SMITH, 1995).

Histologicamente, o baço dos Odontocetos é constituído pelos nódulos linfóides, polpa vermelha e um sistema trabéculo-capsular composto por tecido elástico fibroleiomiocítico (Figura 5) (NAKAMINE et al., 1992). Ainda segundo estes autores, a bainha linfóide periarteriolar (PALS) é pouco definida nestes animais (NAKAMINE et al., 1992).

Com relação à polpa vermelha, duas camadas, a zona intermediária e a camada perivenosa podem ser observadas (NAKAMINE et al., 1992).

A camada perivenosa é constituída por vênulas e tecido reticular intervascular, o qual é abundante em células mielóides. As veias associadas à coleta e drenagem sanguínea estão localizadas nesta camada. No sentido estrito, esta camada corresponde à polpa vermelha dos mamíferos comuns (NAKAMINE et al., 1992).

Nos Odontocetos, o baço apresenta duas rotas de drenagem venosa: sistemas hilar e capsular. Isto sugere um estágio primitivo da evolução e pode ser um exemplo adicional do baço de mamíferos primitivos (NAKAMINE et al., 1992).

E finalmente, de forma semelhante às espécies terrestres, o baço dos cetáceos apresenta tamanho máximo com o início da puberdade e subsequentemente depleta com o aumento da idade, a qual é denominada de atrofia senil. Interessantemente, segundo Romano et al. (1993), os nódulos linfóides são raros ou totalmente ausentes em animais adultos.

Figura 5 – Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. AC: Arteríola central; PALS: Bainha linfóide periarteriolar; PV: Polpa vermelha; T: Tecido elástico fibroleiomiocítico; ZM: Zona marginal. Caso BP 152. Hematoxilina e eosina, 100x

3.5 Citocinas

As citocinas são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células do sistema imunológico. Têm função autócrina, agindo na própria célula produtora; parácrina, atuando em células próximas, ou endócrina, quando sua ação é à distância (VARELLA; FORTE, 2001).

Dentre todas as citocinas, as que têm se mostrado muito importantes nos mecanismos de defesa pulmonares dos mamíferos incluem o TGF- β (BARTRAM; SPEER, 2004), TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-10 e IL-12 (DELCLAUX; AZOULAY, 2003).

3.5.1 TGF- β

O fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) é membro de uma família de fatores de crescimento e diferenciação celulares que apresenta múltiplas funções em diversos órgãos e sistemas. O TGF- β é notável pela sua capacidade em modular uma variedade de comportamentos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose (SPORN; ROBERTS, 1992).

A presença do TGF- β no pulmão normal sugere sua participação na regulação natural dos processos fisiológicos, com vistas a manter a homeostasia pulmonar (BARTRAM; SPEER, 2004).

Dentre suas funções, pode-se incluir a sua capacidade de realizar o controle do reparo tecidual, uma vez que o TGF- β é um quimioatratante para monócitos e macrófagos (BARTRAM e SPEER, 2004). Além do mais, o TGF β é capaz de induzir vários outros fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), os fatores de crescimento do fibroblasto (FGFs) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (VAN OBBERGHEN-SCHILLING et al., 1988).

3.5.2 TNF- α

Segundo Le e Vilcek (1987), de todas as citocinas estudadas, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) aparece como um dos mais importantes componentes da defesa do hospedeiro mediada por citocinas contra bactérias, incluindo as micobactérias, fungos e parasitas.

Trata-se de substância sintetizada por numerosas células incluindo as células NK, B e T, monócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos, células de Kupfer, astrócitos, neurônios, fibroblastos, osteoblastos, células da musculatura lisa, células espermatogênicas, células da granulosa e queratinócitos, dentre outros (KILBOURN, 1990).

A sua produção é estimulada por diversos fatores. Por exemplo, nos macrófagos, a síntese de TNF- α pode ser induzida por fatores biológicos, químicos e

físicos, incluindo desta forma, vírus, produtos bacterianos (LPS), produtos parasitários, células tumorais, citocinas (IL-1, IL-2, IFN- γ), isquemia e traumas, dentre outros (KILBOURN, 1990).

A principal atividade biológica do TNF- α é a acentuada citólise em diferentes linhagens neoplásicas, tendo ação anti-tumoral importantíssima. É também o principal mediador da caquexia nas neoplasias malignas (MACKAY et al., 1993; TARTAGLIA et al., 1993).

Além das ações nos processos neoplásicos acima mencionadas, o TNF- α está associado também às alterações endoteliais, principalmente à perda das propriedades anticoagulantes normais do endotélio, à atividade quimiotática e à estimulação do metabolismo oxidativo de fagócitos. Ainda, esta substância exibe atividade de pirógeno endógeno, aumentando a reabsorção óssea, a atividade de adipócitos e a expressão de MHC-I e II (MACKAY et al., 1993).

3.5.4 IL-12

A IL-12 foi originalmente identificada pela sua capacidade em sinergizar com a IL-2 na secreção do IFN- γ e na atividade citolítica das células NK e linfócitos citotóxicos (GATELY et al., 1986; CHAN et al., 1991). Sendo assim, a ação principal da IL-12 é estimular a proliferação das células NK (ZEH, 1994).

Esta sinergia que a IL-12 apresenta não é restrita à IL-2. A IL-12 também sinergiza com a IL-4, promovendo a expansão das células NK (NAUME, 1993), assim como com a IL-1, para induzir a produção de IFN- γ (STORKUS et al., 1998).

A IL-12 promove a imunidade mediada por células T *helper* 1 (Th1), sendo muito importante na ação contra microorganismos intracelulares, corpos estranhos e oncogênese (STORKUS et al., 1998).

E finalmente, Chan et al. (1991) demonstraram que a IL-12 está também envolvida na seleção do isotipo das imunoglobulinas inibindo, desta forma, a síntese de IgE.

3.6 Lisozima

A primeira linha de defesa do sistema respiratório está associada às barreiras físicas, tais como o muco e cílios, e é seguida por diversos mediadores que constituem a resposta inata. Estes incluem lisozima, lactoferrina, colectinas e defensinas (BOYTON; OPENSHAW, 2002).

A lisozima é o polipeptídeo mais abundante nas secreções do trato respiratório de mamíferos (GANZ, 2002). É encontrada em grânulos primários e secundários dos neutrófilos, como também em grânulos de fagócitos mononucleares (GANZ, 2002; KAWASHIMA et al., 2004b).

Esta proteína atua sobre a parede celular das bactérias e fungos, por hidrolisar a ligação β 1-4 glicosídica entre N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, que são componentes estruturais dos peptídeoglicanos bacterianos e quitina fúngica, respectivamente (GANZ, 2002). Ainda, em geral a lisozima exibe maior efeito microbicida contra bactérias Gram positivas do que negativas (ELLISON; GIEHL, 1991; GANZ, 2002). Desta forma, a ação antimicrobiana desta proteína contribui para a defesa inata do hospedeiro (COLE et al., 2002).

Ressalta-se ainda que citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α , são capazes de elevar os níveis da lisozima, como também estimular o *burst* respiratório (SEDGWICK et al., 2000; PULSEN et al., 2001), fazendo com que esta proteína seja observada em concentrações elevadas nos locais de inflamação (GANZ, 2002).

3.7 Proteínas da família S-100

S-100 é uma família de pequenas (10-14kDa) proteínas ligantes de cálcio (SCHAFFER; HEIZMANN, 1996; DONATO, 1999). Mais de 20 membros de proteínas desta família já foram descritos (HEIZMANN, 2002) e estão associadas a atividades regulatórias intra e extracelulares (DONATO, 2001).

No interior das células, esta família de proteínas tem sido associada a

diversos processos celulares incluindo regulação da fosforilação protéica, atividades enzimáticas diversas, dinâmica dos componentes do citoesqueleto, fatores de transcrição, hemostasia do cálcio e proliferação e diferenciação celulares (DONATO, 2001). Além disto, elas atuam em várias outras atividades celulares, como transdução de sinais, regulação e motilidade celulares e progressão no ciclo celular (HEIZMANN, 2002).

As proteínas S-100 estão associadas também à sobrevivência neuronal e/ou diferenciação e proliferação de astrócitos, morte neuronal por apoptose, como também a estimulação e/ou inibição da atividade de células inflamatórias (DONATO, 2001).

Estão correlacionadas ainda aos processos de ativação de neutrófilos e monócitos (LEMARCHAND et al., 1992), adesão celular (NEWTON; HOGG, 1998) e propriedades microbidas (JOHNE et al., 1997). Muitas são quimiotáticas (KOMADA et al., 1996) e têm sido localizadas em elevadas concentrações nos sítios inflamatórios (HOFMANN et al., 1999).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e Material selecionado

Dentre o material arquivado junto ao Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos – BTMM - do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens - LAPCOM – do Departamento de Patologia VPT – da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – da Universidade de São Paulo – USP, foram separadas amostras teciduais de 34 animais da espécie *P. blainvillei* (Figura 6).

Os animais amostrados foram divididos em dois grupos: (a) Grupo 1 – G1: Animais do grupo controle, ou seja, animais sem processos inflamatórios pulmonares; (b) Grupo 2 – G2: Animais com processos inflamatórios pulmonares (Figura 7). O anexo A apresenta todos os 34 casos selecionados, distribuídos em função do número de tombo, sexo, faixa etária, maturidade sexual, origem, local e data de necropsia. As informações do anexo acima foram, parcialmente, obtidas e tabuladas durante a realização de trabalhos prévios desenvolvidos no LAPCOM (MARIGO, 2003; RUOPPOLO, 2003)

4.2 Análise Histopatológica

O processamento histopatológico foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia - FMVZ/USP. Todos os fragmentos teciduais foram submetidos ao método convencional de preparação de lâminas histológicas. As peças passaram pelos processos de desidratação e diafanização, banho em parafina líquida, inclusão em bloco, e posterior corte em micrótomo rotativo. Os cortes, de aproximadamente 4µm de espessura, foram posteriormente submetidos ao método de coloração pela Hematoxilina e Eosina (PROPHET et al., 1992).

Uma vez obtidas as lâminas, foi realizada a avaliação histopatológica de todos os fragmentos teciduais através da análise independente de um observador,

sendo que os diagnósticos morfológicos relativos às alterações pulmonares e esplênicas foram indexados conforme preconizado por Montali (informação pessoal)¹ (Apêndice A).

4.3 Padronização das reações imuno-histoquímicas

Os fragmentos de baço de dois animais da espécie *P. blainvillei* (MOCA 205 e MOCA 208) foram submetidos ao exame imuno-histoquímico junto ao Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, como também no Departamento de Patologia da Universidade de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha.

Foram testados inicialmente anticorpos anti-linfócitos T, anti-linfócitos B, anti macrófagos, anti-cadeias leve Kappa e Lambda de imunoglobulina e anti-citocinas de utilização rotineira em ambos os laboratórios. Além disto, foram utilizados anticorpos anti-lisozima e anti-S100 humanos. Para os anticorpos humanos, os controles utilizados foram tecidos humanos comprovadamente positivos para as substâncias pesquisadas.

O painel de anticorpos empregado está apresentado na tabela 1 e as diluições utilizadas e os sistemas de detecção estão listados na tabela 2.

¹ Informação fornecida por Montali no National Zoological Park, Smithsonian Institute, em Washington, DC, EUA, em 1993.

Tabela 1 – Distribuição dos anticorpos testados para padronização das reações imuno-histoquímicas em baço de *Pontoporia blainvillei*, em função da especificidade, fabricante, clone, isotipo, espécie de origem e espécie alvo - São Paulo - 2008

Especificidade	Código/ Fabricante	Clone	Isotipo	Espécie de origem	Espécie alvo
anti - CD45RO (Linfócitos B)	M 0742/ Dako	UCHL1 ¹	IgG2a	Camundongo	Homem
anti - CD79α (Linfócitos B)	M 7051/ Dako	HM57 ²	IgG1	Camundongo	Homem
anti - CD20 (Linfócitos T)	M 0755/ Dako	L26 ¹	IgG2a	Camundongo	Homem
anti - CD3 (Linfócitos T)	A 0452/ Dako ¹	---	---	Coelho	Homem
anti - CD3ε (Linfócitos T)	MCA 1477 / Serotec	CD3-12 ²	IgG1	Rato	Homem
anti - CD68 (Macrófagos)	M 0876/ Dako	PG-M1 ¹	IgG3	Camundongo	Homem
Anti-MAC387 (Monócitos)	M 0747/ Dako	MAC 387 ²	IgG1	Camundongo	Homem
MHC-II	171 D3	171 D3 ²	IgG3	Camundongo	Bovino
Cadeia leve Kappa imunoglobulina	A 0191/ Dako ²	---	---	Coelho	Homem
Cadeia leve Lambda da imunoglobulina	A 0193/ Dako ²	---	---	Coelho	Homem
S100	Z 0311/ Dako	Z0311 ^{1,2}	---	Coelho	Homem
Lisozima	A 0099/ Dako	EC 3.2.1.17 ^{1,2}	---	Coelho	Homem
IL-10	MAB 217/ R&D Systems	23738 ¹	IgG2b	Camundongo	Homem
IL-12	MAB 219/ R&D Systems	24910 ¹	IgG1	Camundongo	Homem
IL-12	Hibridoma / American Type Cell Culture	C 17.8 ^{3,4}	---	Rato	Camundongo
IFN-γ	MAB 285/ R&D Systems	25718 ¹	IgG2a	Camundongo	Homem
IFN-γ	Hibridoma / American Type Cell Culture	XMG 1 ^{3,4}	---	Rato	Camundongo
TNF-α	AF 210 NA/ R&D Systems ¹	---	IgG	Cabra	Homem
TNF-α	Hibridoma / American Type Cell Culture	C1 AC ^{3,4}	IgG1	Rato	Camundongo
TGF-β	MCA 797/ Serotec	MCA 797 ^{1,2}	IgG1	Camundongo	Homem
TGF-β	SC-82/ Santa Cruz Biotechnology	SC-82 ¹	IgG	Coelho	Homem

¹ Anticorpo gentilmente disponibilizado pela Profa Dra. Maria Irma Seixas Duarte, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo.

² Reações imuno-histoquímicas realizadas pelo Dr. Andreas Beineke, no Departamento de Patologia, da Universidade de Medicina Veterinária de Hannover, Alemanha

³ Anticorpo gentilmente disponibilizado pela Profa Dra. Ises de Almeida Abrahamsohn, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

⁴ Informações relativas aos anticorpos estão listadas na "American Type Culture Collection" (ATCC® - www.atcc.org).

Tabela 2 - Distribuição dos anticorpos testados para a padronização das reações imuno-histoquímicas em baço de *Pontoporia blainvillei*, em função da especificidade, fabricante, exposição antigênica, sistema de detecção e diluição- São Paulo - 2008

Especificidade	Código/ Fabricante	Exposição antigênica	Sistema de detecção	Diluição	Referências
anti - CD45RO (Linfócitos B)	M 0742/ Dako	Calor úmido	Advance	1:25/1:50	KUMAR e COWAN (1994)
anti - CD79α (Linfócitos B)	M 7051/ Dako	Radiação	EnVision	1:40	HAMMER et al. (2005)
anti - CD20 (Linfócitos T)	M 0755/ Dako	Radiação	SABC	1:10/1:20	KUMAR e COWAN (1994)
anti - CD3 (Linfócitos T)	A 0452/ Dako	Calor úmido	Advance	1:100	Conforme o fabricante
anti - CD3ε (Linfócitos T)	MCA 1477 / Serotec	Sem exposição antigênica	SABC	1:100	JONES et al. (1993)
anti - CD68 (Macrófagos)	M 0876/ Dako	Calor úmido	Advance	1:10/1:20	Conforme o fabricante
Anti-MAC387 (Monócitos)	M 0747/ Dako	Radiação	SABC	1:100	KUMAR e COWAN (1994)
MHC-II	171 D3	Sem exposição antigênica	SABC	1:400	TAYLOR et al. (1993)
S100	Z 0311/ Dako	Calor úmido	Novo Link Polymer	1:500/ 1:1000	Conforme o fabricante
Lisozima	A 0099/ Dako	Calor úmido	Novo Link Polymer	1:500/ 1:1000	Conforme o fabricante
Cadeia leve Kappa da imunoglobulina	A 0191/ Dako	Radiação	SABC	1:12800	KUMAR e COWAN (1994)
Cadeia leve Lambda da imunoglobulina	A 0193/ Dako	Radiação	SABC	1:1200	KUMAR e COWAN (1994)
IL-10	MAB 217/ R&D Systems	Calor úmido	LSAB-HP	1:10/1:20	Conforme o fabricante
IL-12	MAB 219/ R&D Systems	Calor úmido	LSAB-HP	1:10/1:20	Conforme o fabricante
IL-12	Hibridoma / American Type Cell Culture	Calor úmido	LSAB-HP	1:50/ 1:100	Conforme o fabricante
IFN-γ	MAB 285/ R&D Systems	Calor úmido	LSAB-HP	1:10/1:20	Conforme o fabricante
IFN-γ	Hibridoma / American Type Cell Culture	Calor úmido	LSAB-HP	1:100/ 1:200	Conforme o fabricante
TNF-α	AF 210 NA/ R&D Systems	Calor úmido	LSAB-HP	1:20/ 1:40	Conforme o fabricante
TNF-α	Hibridoma / American Type Cell Culture	Calor úmido	LSAB-HP	1:100/ 1:200	Conforme o fabricante
TGF-β	MCA 797/ Serotec	Calor úmido	Advance	1:25/ 1:50	Conforme o fabricante
TGF-β	SC-82/ Santa Cruz Biotechnology	Calor úmido	Novo Link Polymer	1:100/ 1:200	Conforme o fabricante

LASB-HP: Kit imuno-histoquímico para peroxidase

Novo Link Polymer: Kit imuno-histoquímico para peroxidase

Envision: Kit imuno-histoquímico para peroxidase

Novolink: Kit imuno-histoquímico para peroxidase

4.3.1 Imunofenotipagem das células inflamatórias de *P. blainvillei*

Cortes histológicos de 4µm, obtidos conforme descrito no item 4.2, foram colhidos em lâminas previamente silanizadas com solução adesiva 3-aminopropyltiethoxy-silane (Sigma, Código A-3648).

O processamento do material para a imunofenotipagem das células inflamatórias ocorreu de acordo com o preconizado por Sá (2004). Resumidamente, os cortes foram submetidos à desparafinização em dois banhos de xilol. O primeiro banho foi realizado por 30 minutos, em estufa a 56°C. O segundo banho foi a temperatura ambiente, por 10 minutos. Os cortes foram hidratados em sequência decrescente de álcoois (100%, 95%, 70%) por cinco minutos cada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente por 5 minutos.

Antes da próxima etapa, os cortes foram lavados em água destilada e em PBS (Solução *phosphate buffer saline* pH 7,4), por cinco minutos cada.

Em seguida, foi realizado o bloqueio dos pigmentos de formol, submetendo os cortes à imersão em solução de hidróxido de amônio 25% diluído em álcool 95%, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Após esta etapa, os cortes foram lavados novamente em água corrente, água destilada e PBS, por cinco minutos cada.

O bloqueio de peroxidase endógena foi feito em câmara escura com três incubações em água oxigenada (H₂O₂) 10 volumes a 3%, por 10 minutos cada. Os cortes foram então lavados em água corrente, água destilada e PBS, por cinco minutos cada.

A etapa seguinte foi a recuperação antigênica com calor úmido, utilizando-se a panela de vapor Steam Cuisine 700 Hi Speed (T-Fal®), deixando as lâminas em solução de recuperação antigênica (solução *retrieval*) pH 9,0 (Dako, Código S2367), pré-aquecido a 90 - 95°C, por 20 minutos.

Para os anticorpos anti-CD79α, anti-CD20 e anti-MAC387, a exposição antigênica foi realizada por radiação, usando-se um microondas com potência entre 650-720W, por 5 minutos.

Na recuperação antigênica dos anticorpos anti-CD79α e anti-CD20, utilizou-se tampão citrato 0,01m, pH 6,0, por 5 minutos. Para os anticorpos anti-S100 e anti-lisozima utilizou-se a solução tampão Tris-Citrato pH 7,2, durante esta etapa.

Após a recuperação antigênica, as lâminas esfriaram a temperatura ambiente e foram lavadas com água corrente, água destilada e PBS por cinco minutos cada.

Para os bloqueios das proteínas endógenas, as lâminas foram incubadas em solução 10% de leite desnatado (leite Molico Nestlé®), por 30 minutos, a temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário específico ao antígeno pesquisado, diluído em solução de soro-albumina-bovina (BSA) a 1%. A incubação foi feita por 18 horas, a 4°C e em câmara úmida. Por outro lado, para os anticorpos anti-MAC-387, anti-CD20, anti-cadeia leve Kappa da imunoglobulina e anti-cadeia leve Lambda da imunoglobulina, a incubação dos mesmos foi realizada por apenas 2 horas, a 37°C, em câmara úmida.

No dia seguinte, após duas lavagens com PBS, por 5 minutos, procedeu-se a incubação com anticorpo secundário anti-imunoglobulina da espécie animal do anticorpo primário. Esta etapa teve duração de 30 minutos e foi realizada a 37°C em câmara úmida.

Em seguida, os cortes passaram por duas lavagens, de 5 minutos cada, em PBS.

O próximo passo envolveu a incubação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase por 30 minutos, a 37°C em câmara úmida.

No caso dos anticorpos anti-S100 e anti-lisozima, o método utilizado foi similar, mas o sistema de detecção empregado foi o Novo Link Polymer (Novocastra, Código RE 7260-K). Para os anticorpos CD45RO, CD68 e CD3, empregou-se o sistema Advance (Dako, Código K 4068). Para o anticorpo anti-CD79 α , usou-se o sistema EnVision (DAKO EnVision™+ System, HRP). Finalmente, para o anticorpo anti-MHC II foi empregado o sistema BA 2000 (Vector Laboratories) (Tabela 3).

A reação imuno-histoquímica foi revelada com uma solução cromógena de diaminobenzidina (DAB, 3,3'- diaminobenzidina, Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA, Código D-5637). Diluíram-se 40 μ g do cromógeno DAB em 100 ml de PBS. Esta solução foi filtrada e em seguida foram adicionados à solução 1200 μ l de H₂O₂ 10 volumes a 3%. O tempo mínimo de revelação foi de 2 minutos.

Por fim, os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e contracolorados com hematoxilina de Mayer's (Dako North America, Carpinteria, CA, USA, código S3309) por cerca de 1 minuto.

A montagem das lâminas foi feita com resina Permount® (Fisher Scientific, Código SP-15-100) e o exame em microscopia de luz.

4.3.2 Imunomarcacão das citocinas de *P. blainvillei*

Para a imunomarcacão da expressão de citocinas, foi empregado a técnica imuno-histoquímica de estreptavidina-biotina-peroxidase (SABC) (HSU; RAINE, 1981), com métodos parcialmente modificados e padronizados pelo Laboratório da Disciplina de Patologia de Moléstias Transmissíveis do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dentre as etapas diferenciais, para os anticorpos anti-IL-10, anti-IL-12 (R&D System, Código MAB 219), anti-IFN- γ (R&D System, Código MAB 285) e anti-TNF- α (R&D System, Código AF 210 NA), os cortes histológicos foram incubados em solução de PBS-Saponina (Solução tampão PBS pH 7,4 contendo saponina 0,1% - Sigma Chemical Co. St. Louis, MO/USA, Código S 7900) por 10 minutos a temperatura ambiente. Antes e após a incubação com o anticorpo secundário, os cortes foram novamente colocados em solução tampão PBS-Saponina por 10 minutos a temperatura ambiente. E em seguida, as lâminas foram lavadas por 5 minutos, em solução tampão PBS pH 7,4.

Para os anticorpos anti-IL-12 (Clone C17.8), anti-IFN- γ (Clone XMG1) e anti-TNF- α (Clone C1-AC) utilizou-se a solução tampão Tris-Citrato pH 7,2, durante a exposição antigênica. Para os demais anticorpos anti-citocinas utilizou-se a solução de recuperação antigênica (solução *retrieval*) pH 9,0 (Dako, Código S2367).

Há que se ressaltar que o método da estreptavidina-biotina-peroxidase não foi utilizado quando do emprego de cinco anticorpos. Desta forma, para o anticorpo anti-TGF- β (Serotec, Código MCA) foi utilizado o sistema de detecção Advance (Dako, Código K 4068), enquanto que para os anticorpos anti-TGF- β (Santa Cruz Biotechnology, Código SC-82), anti-IL-12 (Clone C17.8), anti-IFN- γ (Clone XMG1) e anti-TNF- α (Clone C1AC) o sistema de detecção empregado foi o Novo Link Polymer (Novocastra, Código RE 7260-K) (Tabela 3).

4.4 Análise quantitativa da expressão pulmonar das proteínas S-100 e lisozima, e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em *P. blainvillei* acometida ou não de processo inflamatório pulmonar

A Análise Quantitativa (AQT) das expressões das proteínas S-100 e Lisozima, e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α nos pulmões foi realizada a partir das lâminas processadas conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

A contagem das células imunomarcadas foi realizada em microscopia óptica (LEICA[®] DMLS), conforme Sá (2004). Foi utilizado um retículo graduado que apresenta uma área de $6,25 \times 10^{-2} \text{ mm}^2$, sob a objetiva de 400x.

As células imunomarcadas foram contadas em 10 campos sequenciais de 400x. Durante a contagem, primeiramente o retículo graduado foi posicionado no canto superior esquerdo do fragmento pulmonar no aumento de 400x. Foram contabilizadas as células positivamente marcadas localizadas tanto nos septos interalveolares, como no interior dos alvéolos. Após a análise deste primeiro campo, o retículo graduado foi transferido para um campo imediatamente abaixo deste, e assim sucessivamente.

O número médio de células positivas encontradas para cada anticorpo utilizado, nos 10 campos, foi dividido por $6,25 \times 10^{-2}$, para se obter o número médio de células imunomarcadas por área de tecido pulmonar. Os resultados foram expressos em número de células marcadas/ mm^2 .

4.5 Análise quantitativa da expressão esplênica das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF-beta, IL-12 e TNF-alfa em *P. blainvillei* acometida ou não de processo inflamatório pulmonar

A AQT da expressão esplênica das proteínas S-100 e Lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α foi realizada a partir das lâminas processadas conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

Os procedimentos morfométricos adotados foram semelhantes aos descritos

no item 4.4.1, exceto pelo fato de terem sido analisados 20 campos sequenciais de 400x, sendo 10 campos envolvendo a polpa branca e os outros 10 incluindo a polpa vermelha. Os resultados foram expressos em número de células marcadas/mm².

4.6 Análise do grau de depleção esplênica de *P. blainvillei*

O tamanho médio das polpas brancas foram mensurados nos baços dos animais pertencentes aos grupos G1 e G2.

Inicialmente, as seções histológicas do baço de cada animal foram digitalizadas e a avaliação morfométrica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o auxílio do programa *Image Pro Plus*® 4.5 (Media Cybernetics). De cada animal foram mensuradas as áreas de 10 polpas brancas escolhidas aleatoriamente.

Primeiramente, a objetiva do microscópio óptico (Nikon® OPTIPHOT-2) foi posicionada no canto superior esquerdo do fragmento esplênico sob a objetiva de 400x para a mensuração da área da polpa branca. Após a análise deste primeiro campo, a objetiva foi transferida para um campo imediatamente abaixo deste, e assim sucessivamente. Os resultados foram expressos em μm^2 .

Em seguida, o grau de depleção linfóide de cada animal foi determinado, baseando-se na classificação proposta por Beineke et al. (2007b), que estabeleceram: Grau I: Baço normal (Área média da polpa branca: $\geq 200,000 \mu\text{m}^2$); Grau II: Depleção esplênica discreta (Área média da polpa branca: $\geq 100,000 - 200,000 \mu\text{m}^2$); Grau III: Depleção esplênica moderada (Área média da polpa branca: $\geq 50,000 - 100,000 \mu\text{m}^2$); Grau IV: Depleção esplênica intensa (Área média da polpa branca $< 50,000 \mu\text{m}^2$).

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores obtidos na AQT da imunoexpressão das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α nos fragmentos pulmonares e esplênicos de cada grupo animal foram analisados pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney (MORETTIN; BUSSAD, 2006). Em todos os testes, os resultados foram considerados significantes para $p < 0,05$.

O teste não-paramétrico Mann-Whitney também foi utilizado para analisar os graus de depleção linfóide esplênica observados nos animais de cada grupo.

Para todos os procedimentos estatísticos, o software utilizado foi o GraphPad GraphPad PRISM - v.5.0[®] (GraphPad Software, Inc; 5755 Oberlin Drive, San Diego 92121, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 Animais

Com relação ao sexo dos animais, 53% (18/34) eram machos e 47% (16/34) fêmeas (Anexo A).

A faixa etária (Gráfico 1) dos indivíduos foi estimada a partir da avaliação da dentição dos animais e 44,1% (15/34) foram considerados jovens, 41,2% (14/34) adultos e 3% (1/34) filhotes. A faixa etária não foi determinada em 11,7% (4/34) dos indivíduos.

Gráfico 1 – Distribuição da faixa etária dos 34 casos de *Pontoporia blainvillei* mantidos pelo Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos - LAPCOM - e selecionados para o desenvolvimento do projeto - São Paulo - 2008

Para se avaliar a maturidade sexual dos animais, foi utilizada a classificação proposta por Rosas e Monteiro-Filho (2002), devido à ausência de dados de maturidade sexual através de análises histológicas de gônadas nesses animais. Segundo os estes autores, indivíduos machos são considerados maduros sexualmente com comprimento total a partir de 112 cm e fêmeas a partir de 122 cm.

Desta forma, no presente trabalho 55,9% (19/34) dos indivíduos foram

classificados como maduros e 35,3% (12/34) como sexualmente imaturos. Em 8,8% (3/34) dos animais, a maturidade sexual não foi determinada (Anexo A).

Com relação à origem dos animais, 91,2% (31/34) foram oriundos de captura por rede de pesca, enquanto 8,8% (3/34) foram provenientes de encalhe (Anexo A).

De acordo com local de procedência, 50% (17/34) dos animais foram provenientes do litoral central do Estado de São Paulo, 41,2% (14/34) do litoral sul do Estado do Rio Grande do Sul e 8,8% (3/34) do litoral sul do Estado de São Paulo (Anexo A).

Deve-se ressaltar que estas informações foram parcialmente publicadas por Marigo (2003) e Ruoppolo (2003).

6.2 Análise histopatológica

As alterações histopatológicas observadas nos pulmões dos animais pertencentes ao grupo controle (G1) estão descritas na tabela 3. A tabela 4 apresenta os diagnósticos morfológicos dos animais do G2.

Todos os animais (n=8) do G1 apresentaram congestão e edema pulmonares (Figura 8) e 62,5% (3/8) dos animais deste grupo também apresentaram hemorragia pulmonar.

Tabela 3 – Distribuição dos diagnósticos morfológicos principais observados no pulmão de *Pontoporia blainvillei* pertencentes ao Grupo 1 (N = 8), em função do número do tombo, sexo e faixa etária - São Paulo - 2008

N	Número do tombo	Sexo	Faixa etária	Diagnósticos morfológicos principais
1	BP 152	F	Adulto	Congestão e edema intensos. Hemorragia intensa e multifocal.
2	MOCA 199	M	Jovem	Congestão e edema intensos.
3	MOCA 200	M	Jovem	Congestão e edema intensos. Hemorragia moderada e multifocal.
4	MOCA 203	M	Jovem	Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
5	MOCA 204	M	Jovem	Congestão e edema intensos. Hemorragia moderada e multifocal.
6	MOCA 209	F	Jovem	Congestão e edema intensos.
7	MOCA 212	F	Jovem	Congestão e edema intensos.
8	MOCA 213	F	Jovem	Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.

No G2 (Tabela 4), a broncopneumonia (Figuras 9, 10) foi observada em 57,7% (15/26) dos animais, 38,5% (10/26) demonstraram pneumonia intersticial e a pleuropneumonia intersticial foi notada em 3,8% (1/26) dos indivíduos. Cristais de colesterol intralesionais (Figura 11) foram encontrados em 23% (6/26) dos animais amostrados neste grupo. E finalmente, evidenciaram-se agregados bacterianos multifocais no parênquima respiratório de 15,4% (4/26) dos animais do G2.

Tabela 4 – Distribuição dos diagnósticos morfológicos principais observados no pulmão de *Pontoporia blainvillei* pertencentes ao Grupo 2 (N = 26), em função do número do tombo, sexo e faixa etária - São Paulo - 2008

(Continua)

N	Número do tombo	Sexo	Faixa etária	Diagnósticos morfológicos principais
1	BP 12	F	Adulto	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica moderada, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
2	BP 13	M	Jovem	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica intensa, multifocal e crônica. Pleurite linfoplasmohistiocitária discreta, multifocal e crônica. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
3	BP 31	M	Jovem	Broncopneumonia granulomatosa intensa, multifocal e associada a cristais de colesterol intralesionais. Pleurite linfoplasmohistiocitária e neutrofílica moderada e multifocal. Congestão e edema intensos.
4	BP 44	F	Adulto	Broncopneumonia granulomatosa, necrótica, intensa, multifocal e associada à miríade de bactérias intralesionais. Congestão e edema intensos. Hemorragia moderada e multifocal.
5	BP 45	F	NR	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos.
6	BP 56	M	Jovem	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
7	BP 111	F	NR	Pneumonia intersticial linfohistiocitária, multifocal, aguda e associada à miríade de bactérias intralesionais. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
8	BP 136	M	Adulto	Pneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
9	BP 141	M	Adulto	Broncopneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta e multifocal. Congestão e edema intensos. Hemorragia moderada e multifocal.
10	BP 146	F	Filhote	Pneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta e multifocal. Congestão e edema intensos.
11	BP 151	F	NR	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária moderada, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos.
12	BP 153	F	Adulto	Broncopneumonia granulomatosa moderada e multifocal associada a cristais de colesterol intralesionais. Congestão e edema intensos.
13	BP 155	F	Jovem	Pneumonia intersticial linfohistiocitária discreta e multifocal. Congestão e edema intensos. Hemorragia intensa e multifocal.
14	BP 156	F	Adulto	Pneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária e neutrofílica, discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos. Hemorragia intensa e multifocal.

(Conclusão)

N	Número do tombo	Sexo	Faixa etária	Diagnósticos morfológicos principais
15	BP 159	M	Adulto	Pneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária discreta e multifocal. Congestão e edema intensos.
16	BP 160	M	Jovem	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta e multifocal. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
17	BP 161	F	Adulto	Broncopneumonia linfoplasmohistiocitária e neutrofílica discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos.
18	IPEC 095	M	Adulto	Pleuropneumonia intersticial linfocitocitária e neutrofílica intensa, discreta, multifocal, aguda e associada à miríade de bactérias intralesionais. Congestão e edema intensos.
19	MOCA 176	M	Adulto	Broncopneumonia linfocitocitária discreta e multifocal. Folículos linfóides peribronquiais com hiperplasia intensa. Congestão e edema intensos. Hemorragia moderada e multifocal.
20	MOCA 178	M	Adulto	Pneumonia intersticial histiocitária e neutrofílica discreta, multifocal e aguda. Congestão intensa. Edema moderado. Hemorragia discreta e multifocal.
21	MOCA 194	F	Jovem	Broncopneumonia granulomatosa moderada e multifocal associada a cristais de colesterol intralesionais. Congestão e edema intensos. Hemorragia intensa e multifocal.
22	MOCA 202	M	Jovem	Broncopneumonia linfocitocitária moderada, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos. Hemorragia discreta e multifocal.
23	MOCA 205	M	Jovem	Pneumonia intersticial granulomatosa moderada e multifocal associada a cristais de colesterol intralesionais.
24	MOCA 208	M	Adulto	Pneumonia intersticial granulomatosa moderada e multifocal associada a cristais de colesterol e miríade de bactérias intralesionais.
25	MOCA 215	M	NR	Pneumonia intersticial linfoplasmohistiocitária discreta, multifocal e aguda. Congestão e edema intensos.
26	PA 132	F	Adulto	Broncopneumonia granulomatosa moderada, multifocal e associada a cristais de colesterol intralesionais. Congestão e edema intensos.

6.3 Padronização das Reações Imuno-histoquímicas

Os resultados da padronização de 20 anticorpos monoclonais e um policlonal testados, conforme descrito no item 4.3, estão listados na tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos resultados obtidos durante a padronização das reações imuno-histoquímica realizadas no baço de *Pontoporia blainvillei*, em função da especificidade, fabricante, clone e diluição - São Paulo - 2008

Especificidade	Código/ Fabricante	Clone	Diluição	Resultados
anti - CD45RO (Linfócitos B)	M 0742/ Dako	UCHL1	1:25/1:50	Negativo
anti - CD79 α (Linfócitos B)	M 7051/ Dako	HM57	1:40	Questionável
anti - CD 20 (Linfócitos T)	M 0755/ Dako	L26	1:10/1:20	Negativo
anti - CD3 (Linfócitos T)	A 0452/ Dako (pAb)	---	1:100	Negativo
anti - CD3 ϵ (Linfócitos T)	MCA2330A488T/ Serotec	CD3-12	1:100	Negativo
anti - CD 68 (Macrófagos)	M 0876/ Dako	PG-M1	1:10/1:20	Negativo
Anti-MAC387 (Monócitos)	M 0747/ Dako	MAC 387	1:100	Negativo
MHC-II	171 D3	171 D3	1:400	Positivo
S100	Z 0311/ Dako	Z0311	1:500/ 1:1000	Positivo
Lisozima	A 0099/ Dako	EC 3.2.1.17	1:500/ 1:1000	Positivo
Cadeia leve Kappa da imunoglobulina	A 0191/ Dako	---	1:12800	Positivo
Cadeia leve Lambda da imunoglobulina	A 0193/ Dako	---	1:1200	Positivo
IL-10	MAB 217/ R&D Systems	23738	1:10/1:20	Negativo
IL-12	MAB 219/ R&D Systems	24910	1:10/1:20	Negativo
IL-12	Hibridoma / American Type Cell Culture	C 17.8	1:50/ 1:100	Positivo
IFN- γ	MAB 285/ R&D Systems	25718	1:10/1:20	Negativo
IFN- γ	Hibridoma / American Type Cell Culture	XMG 1	1:100/ 1:200	Negativo
TNF- α	AF 210 NA/ R&D Systems	---	1:20/ 1:40	Negativo
TNF- α	Hibridoma / American Type Cell Culture	C1 AC	1:100/ 1:200	Positivo
TGF- β	MCA 797/ Serotec	MCA 797	1:25/ 1:50	Positivo
TGF- β	SC-82/ Santa Cruz Biotechnology	SC-82	1:100/ 1:200	Positivo

(pAb): Anticorpo policlonal

Nove anticorpos apresentaram imunomarcção positiva, incluindo anti-MHC II (Clone 171 D3), anti-S100 (Clone Z 0311/ Dako), anti-lisozima (Clone A 0099/ Dako), Cadeia leve Kappa da imunoglobulina (Clone A 0191/ Dako), Cadeia leve Lambda da imunoglobulina (Clone A 0193/ Dako), TNF- α (Clone C1 AC, Hibridoma / American Type Cell Culture), TGF- β (Clone MCA 797/ Serotec e Clone SC-82/ Santa Cruz Biotechnology) e IL-12 (Clone C 17.8, Hibridoma / American Type Cell Culture). Um dos anticorpos (anti - CD79 α , Clone M7051/DAKO) testados apresentou resultado questionável. Os 12 anticorpos restantes não apresentaram reatividade nos protocolos empregados.

6.4 Análise quantitativa da expressão pulmonar das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em *P. blainvillei*

As tabelas 6 e 7 distribuem os valores obtidos na análise morfométrica para a imunoexpressão da lisozima (Figuras 12 e 13), proteína S-100 (Figuras 16 e 17) e das citocinas TGF- β (Figuras 20 e 21), TNF- α (Figuras 24 e 25), IL-12 (Figuras 28 e 29), nos pulmões dos animais do grupos G1 e G2, respectivamente.

Tabela 6 – Análise morfométrica da imunoexpressão pulmonar das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em células marcadas/mm² de tecido pulmonar - São Paulo - 2009

Grupo 1	Lisozima	S100	TGF- β	TNF- α	IL-12
BP 152	72,8	113	17,1	13,2	9,8
MOCA 199	94,4	183	28,8	16	21
MOCA 200	46,4	124,8	8	9,1	10,6
MOCA 203	100,8	187,2	33,6	18	7,2
MOCA 204	11,2	140,8	11,2	12,8	6
MOCA 209	40	145,6	9,6	15,3	5,9
MOCA 212	16	184	57,6	5,6	4,5
MOCA 213	40	156,8	14,4	16	12,7
Média $\pm$ SD	52,7 $\pm$ 33,5	154,4 $\pm$ 28,3	22,5 $\pm$ 16,8	13,2 $\pm$ 4,1	9,7 $\pm$ 5,3

SD: Desvio padrão

Tabela 7 - Análise morfométrica da imunoexpressão pulmonar das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em células marcadas/mm² de tecido pulmonar - São Paulo - 2009

Grupo 2	Lisozima	S100	TGF- β	TNF- α	IL-12
BP 12	54,4	256	27,2	28,4	5,3
BP 13	43,2	352	22,7	12,9	32
BP 31	120	334,4	142,4	11,7	24
BP 44	120	185,6	112	8	6,4
BP 45	216	216	24	32	16
BP 56	162,6	260	48	42,5	40
BP 111	216	207	19,2	33	8
BP 136	106,6	120	30	37,7	16
BP 141	224	195,2	48	19,2	4,5
BP 146	235,4	215,9	26,6	34,2	40
BP 151	147,2	105	77,3	10,6	6,8
BP 153	80	293,3	22,8	41,3	17,76
BP 155	152	124,8	13,7	10	10,4
BP 156	138,6	264	8,8	19,4	11,4
BP 159	189,3	182,7	16	45	15,6
BP 160	184	122,6	37,3	19,3	18
BP 161	176	192	27,4	39	32,3
IPEC 095	101,3	220	40	18,2	28
MOCA 176	190	144	54,8	5,6	9,8
MOCA 178	104	117,3	52	25,2	11,7
MOCA 194	82,2	120	16	16,3	12
MOCA 202	49,6	284,8	72	26,6	10,5
MOCA 205	22,4	328	129,6	7,1	16
MOCA 208	113,6	124,8	25,6	29,4	29,4
MOCA 215	19,2	184	37,2	8,4	27
PA 132	182	234,6	48	24,9	19,8
Média $\pm$ SD	131,9 $\pm$ 63,9	207 $\pm$ 73,5	45,3 $\pm$ 35,1	23,3 $\pm$ 12,2	18 $\pm$ 10,4

SD: Desvio padrão

A análise estatística mostrou que houve diferenças significativas para as expressões pulmonares da lisozima ($p=0,0004$), proteína S100 ($p=0,0370$), TGF- β ($p=0,0428$), TNF- α ($p=0,0384$) e IL-12 ($p=0,0331$) entre os dois grupos investigados.

6.5 Análise quantitativa das expressões esplênicas das proteínas S-100 e lisozima e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em *P. blainvillei*

As tabelas 8 e 9 demonstram os valores obtidos na análise morfométrica para a imunoexpressão da lisozima (Figuras 14 e 15), proteína S-100 (Figuras 18 e 19) e citocinas TGF- β (Figuras 22 e 23), TNF- α (Figuras 26 e 27) e IL-12 (Figuras 30 e 31) no baço dos animais dos G1 e G2, respectivamente.

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa para a expressão esplênica da proteína S100 ($p=0,0135$) entre os animais dos G1 e G2. Por outro lado, não houve diferença estatística com relação às imunoexpressões esplênicas da lisozima ($p=0,0525$) e das citocinas TGF- β ($p=0,4168$), TNF- α ($p=0,3299$) e IL-12 ($p=0,6261$) entre os grupos analisados.

Tabela 8 - Análise morfométrica da imunoexpressão esplênica das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em células marcadas/mm² de tecido esplênico - São Paulo - 2009

Grupo 1	Lisozima	S100	TGF- β	TNF- α	IL-12
BP 152	156	351	239,9	13,2	60,1
MOCA 199	224	697,6	72	16	75
MOCA 200	275,2	609,6	156,8	9,1	42,1
MOCA 203	200	656	179,2	18	84,7
MOCA 204	320	542,4	217,6	12,8	55
MOCA 209	80	396,8	166,4	15,3	39,6
MOCA 212	96	267,2	64	5,6	72
MOCA 213	400	500,8	217,6	16	26,8
Média $\pm$ SD	218 $\pm$ 110,15	502,6 $\pm$ 153,11	164,2 $\pm$ 65,7	49,9 $\pm$ 16,5	56,9 $\pm$ 19,9

SD: Desvio padrão

Tabela 9 - Análise morfométrica da imunoexpressão esplênica das proteínas lisozima, S-100 e das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em células marcadas/mm² de tecido esplênico - São Paulo - 2009

Grupo 2	Lisozima	S100	TGF- β	TNF- α	IL-12
BP 12	560	704	179,2	28,4	70,1
BP 13	512	974,4	102,4	12,9	42,9
BP 31	307,2	771,2	296	11,7	74
BP 44	348,4	742	247	8	36
BP 45	259	693	220,6	32	71,3
BP 56	215	753,9	115,5	42,5	84
BP 111	367	814,8	246	33	27
BP 136	426,3	635,1	163,3	37,7	43,3
BP 141	391	725,6	125,1	19,2	56
BP 146	286,6	741	94	34,2	83,5
BP 151	297	554	93,6	10,6	57
BP 153	387,9	921,4	284,3	41,3	85
BP 155	145	361	102	10	38,3
BP 156	223,1	556	125	19,4	76,1
BP 159	463	778	198	45	29,9
BP 160	345	662,1	76	19,3	37
BP 161	213	499	341	39	68
IPEC 095	554	687	214,1	18,2	38
MOCA 176	141,5	496,5	336,8	5,6	57,6
MOCA 178	297	441	117	25,2	34
MOCA 194	321	789,6	167,6	16,3	49
MOCA 202	366,4	672	227,2	26,6	42
MOCA 205	763,2	608,9	436,8	7,1	56,1
MOCA 208	65,6	472	188,8	29,4	48
MOCA 215	438,4	912	80	8,4	44
PA 132	123,7	563,3	254,7	24,9	39,6
Média $\pm$ SD	339,1 $\pm$ 155	674,2 $\pm$ 152,7	193,5 $\pm$ 93,4	43,6 $\pm$ 12,7	53,3 $\pm$ 17,8

SD: Desvio padrão

6.6 Análise do grau de depleção esplênica

Os valores das áreas de polpa branca encontradas nos G1 e G2 estão apresentadas nas tabelas 10 e 11, respectivamente. A análise estatística para este critério mostrou que não houve diferença significativa ($p=0,2779$) entre os dois grupos analisados.

Tabela 10 – Áreas de polpa branca de *Pontoporia blainvillei* sem alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 1; n = 8). Resultados expressos em μm^2 - São Paulo - 2009

Número do tombo	Área média de polpa branca (μm^2)
BP 152	200.056
MOCA 199	131.346,7
MOCA 200	113.980
MOCA 203	225.235,6
MOCA 204	191.435,8
MOCA 209	118.854
MOCA 212	47.127,3
MOCA 213	116.275,8
Média $\pm$ SD	143.038,9 $\pm$ 58.347

SD: Desvio padrão

Tabela 11 – Áreas de polpa branca de *Pontoporia blainvillei* com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26). Resultados expressos em μm^2 - São Paulo - 2009

Número do tombo	Área de polpa branca (μm^2)
BP 12	133.068
BP 13	35.517,1
BP 31	109.985,7
BP 44	172.908,7
BP 45	64.638,8
BP 56	148.397,4
BP 111	319.822
BP 136	55.252,4
BP 141	299.036,5
BP 146	117.094,5
BP 151	210.147,8
BP 153	263.938
BP 155	355.993
BP 156	150.032,8
BP 159	146.738,8
BP 160	68.334,2
BP 161	42.938,1
IPEC 095	155.270,6
MOCA 176	345.989
MOCA 178	378.478,7
MOCA 194	200.056,4
MOCA 202	174.245,1
MOCA 205	127.492,7
MOCA 208	182.713,6
MOCA 215	164.572,7
PA 132	135.884
Média $\pm$ SD	179.371,2 $\pm$ 97.050

SD: Desvio padrão

Os graus associados à depleção linfóide dos animais dos G1 e G2 podem ser visualizados no gráfico 2 e tabelas 12 e 13, respectivamente. As figuras 32, 33, 34 e 35 demonstram os Graus I, II, III e IV de depleção linfóide esplênica, respectivamente.

Grau I: Baço normal (Área média da polpa branca: $> 200,000 \mu\text{m}^2$), Grau II: Depleção esplênica discreta (Área média da polpa branca: $> 100,000\text{--}200,000 \mu\text{m}^2$), Grau III: Depleção esplênica moderada (Área média da polpa branca: $\geq 50,000\text{--}100,000 \mu\text{m}^2$), Grau IV: Depleção esplênica intensa (Área média da polpa branca $< 50,000 \mu\text{m}^2$). Graduação padronizada de acordo com BEINEKE et al, 2007b.

Gráfico 2 - Distribuição da intensidade de depleção linfóide esplênica de *Pontoporia blainvillei* sem (Grupo 1; n = 8) e com alterações inflamatórias pulmonares (Grupo 2; n = 26) - São Paulo - 2009

Como pode ser observado na tabela 12, 25% (2/8) dos animais do G1 apresentaram baço normal (Grau I). As depleções esplênicas discreta (Grau II) e intensa (Grau IV) foram observadas em 62,5 % (5/8) e 12,50% (1/8) dos animais, respectivamente. Em nenhum animal pertencente ao G1 notou-se depleção esplênica moderada (Grau III).

Tabela 12 – Distribuição da intensidade da depleção linfóide esplênica em *Pontoporia blainvillei* sem alteração inflamatória pulmonar (Grupo 1; n = 8) em função do sexo e faixa etária - São Paulo - 2009

Número do tombo	Sexo	Faixa etária	Grau da depleção linfóide
BP 152	F	Adulto	I
MOCA 199	M	Jovem	II
MOCA 200	M	Jovem	II
MOCA 203	M	Jovem	I
MOCA 204	M	Jovem	II
MOCA 209	F	Jovem	II
MOCA 212	F	Jovem	IV
MOCA 213	F	Jovem	II

M: Macho; F: Fêmea

NR: Não reportado

Grau I: Baço normal (Área média da polpa branca: $> 200,000 \mu\text{m}^2$), Grau II: Depleção esplênica discreta (Área média da polpa branca: $> 100,000\text{--}200,000 \mu\text{m}^2$), Grau III: Depleção esplênica moderada (Área média da polpa branca: $\geq 50,000\text{--}100,000 \mu\text{m}^2$), Grau IV: Depleção esplênica intensa (Área média da polpa branca $< 50,000 \mu\text{m}^2$). Graduação padronizada de acordo com BEINEKE et al, 2007b.

Por outro lado, sete (26,9%) animais do G2 apresentaram baço normal (Grau I). A depleção linfóide discreta (Grau II) foi observada em 53,8% (14/26) dos animais. Além do mais, 11,5% (3/26) e 7,8% (2/26) demonstram depleções linfóides moderada (Grau III) e intensa (Grau IV), respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 – Distribuição da intensidade da depleção linfóide esplênica em *Pontoporia blainvillei* sem alteração inflamatória pulmonar (Grupo 2; n = 26) em função do sexo e faixa etária - São Paulo - 2009

Número do tombo	Sexo	Faixa etária	Grau da depleção linfóide
BP 12	F	Adulto	II
BP 13	M	Jovem	IV
BP 31	M	Jovem	II
BP 44	F	Adulto	II
BP 45	F	NR	III
BP 56	M	Jovem	II
BP 111	F	NR	I
BP 136	M	Adulto	III
BP 141	M	Adulto	I
BP 146	F	Filhote	II
BP 151	F	NR	I
BP 153	F	Adulto	I
BP 155	F	Jovem	I
BP 156	F	Adulto	II
BP 159	M	Adulto	II
BP 160	M	Jovem	II
BP 161	F	Adulto	IV
IPEC 095	M	Adulto	II
MOCA 176	M	Adulto	I
MOCA 178	M	Adulto	I
MOCA 194	F	Jovem	I
MOCA 202	M	Jovem	II
MOCA 205	M	Jovem	II
MOCA 208	M	Adulto	II
MOCA 215	M	NR	II
PA 132	F	Adulto	II

M: Macho; F: Fêmea

NR: Não reportado

Grau I: Baço normal (Área média da polpa branca: $> 200,000 \mu\text{m}^2$), Grau II: Depleção esplênica discreta (Área média da polpa branca: $> 100,000\text{--}200,000 \mu\text{m}^2$), Grau III: Depleção esplênica moderada (Área média da polpa branca: $\geq 50,000\text{--}100,000 \mu\text{m}^2$), Grau IV: Depleção esplênica intensa (Área média da polpa branca $< 50,000 \mu\text{m}^2$). Graduação padronizada de acordo com BEINEKE et al, 2007b.

Figura 6 - Exemplar de cetáceo da espécie *Pontoporia blainvillei*. Caso BP 160

Figura 7 - Pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar congestão e edema intensos, associados à marcante distensão parenquimatosa evidenciado pela visualização do gradil costal. Pneumonia intersticial. Caso BP 155

Figura 8 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar congestão e edema intensos (Seta). Caso MOCA 203. Hematoxilina e eosina, 100×

Figura 9 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei* acometida por Broncopneumonia. Observar infiltrado inflamatório misto intenso e intralveolar (Seta) associado à congestão e edema intensos. Caso BP 12. Hematoxilina e eosina, 200×

Figura 10 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei* acometido por Braoncopneumonia. Observar infiltrado inflamatório misto intralveolar moderado (Seta) associado à congestão intensa. Caso PA 132. Hematoxilina e eosina, 200×

Figura 11 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar a presença de cristais de colesterol (Seta) circundados por infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear associado à presença de células gigantes multinucleadas. Pneumonia granulomatosa por corpo estranho. Caso BP 31. Hematoxilina e eosina, 200×

Figura 12 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 13 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 14 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 15 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão de lisozima (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP12. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 16 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 213. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 17 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso IPEC 095. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 18 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 213. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 19 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da proteína S100 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso IPEC 095. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer® (Novocastra®), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma®), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 20 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF- β (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 21 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF- β (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 22 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF- β (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 200. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 23 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TGF- β (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, técnica do NovoLink Polymer[®] (Novocastra[®]), revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 24 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 204. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400 $\times$

Figura 25 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400 $\times$

Figura 26 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 204. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400 $\times$

Figura 27 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina TNF- α (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 31. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400 $\times$

Figura 28 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 209. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 29 - Fotomicrografia de pulmão de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 30 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal sem alterações inflamatórias pulmonares. Caso MOCA 209. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 31 - Fotomicrografia de baço de *Pontoporia blainvillei*. Observar imunoexpressão da citocina IL-12 (Seta) em animal com alterações inflamatórias pulmonares. Caso BP 12. Reação de imuno-histoquímica, sistema LSAB-HP, revelação com Diaminobenzidina (DAB, Sigma[®]), contra-coloração com Hematoxilina de Mayer, 400×

Figura 32 - Fotomicrografia de baço normal (Grau I = Área média da polpa branca $\geq 200,000 \mu\text{m}^2$) de *Pontoporia blainvillei*, correspondente ao Caso BP 152, com área média efetiva de polpa branca de $200.056 \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100×

Figura 33 - Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau II = Área média da polpa branca $\geq 100,000\text{--}200,000 \mu\text{m}^2$) de *Pontoporia blainvillei*, correspondente ao Caso BP 56, com área média efetiva de polpa branca de $148.397,4 \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100×

Figura 34 - Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau III = Área média da polpa branca $\geq 50,000\text{--}100,000\ \mu\text{m}^2$) de *Pontoporia blainvillei*, correspondente ao Caso BP 160, com área média efetiva de polpa branca de $68.334,2\ \mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100×

Figura 35 - Fotomicrografia de baço com depleção linfóide discreta (Grau IV = Área média da polpa branca $< 50,000\mu\text{m}^2$) de *Pontoporia blainvillei*, correspondente ao Caso BP 161, com área média efetiva de polpa branca de $42.938,1\mu\text{m}^2$. Hematoxilina e eosina, 100×

7 DISCUSSÃO

7.1 Imunofenotipagem das células linfóides

Recentemente, várias pesquisas visando à imunofenotipagem das células linfóides dos cetáceos têm sido desenvolvidas.

A especificidade de anticorpos monoclonais bovino, humano, ovino e murino para diferentes subtipos de leucócitos e o complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC-II) no sangue periférico de *D. leucas* e *T. truncatus* foi confirmada por imunoprecipitação e citometria de fluxo (ROMANO et al., 1992; DE GUISE et al., 1997; SHIRAI et al., 1998).

Além do mais, a reação cruzada de marcadores específicos para vários antígenos de superfície celular do sistema hematopoiético, incluindo células T, células B, histiócitos e MHC-II, foi estabelecida para golfinho-comum (*Delphinus delphis*), golfinho-riscado (*Stenella coeruleoalba*), *T. truncatus* e *P. phocoena*, utilizando a técnica da imunoistoquímica (JKUMAR; COWAN, 1994; BEINEKE et al., 2001; ABER et al., 2003a,b; ZABKA; ROMANO, 2003).

Similarmente, células histiocíticas foram detectadas por reação cruzada usando-se anticorpos humanos específicos para os antígenos CD163, CD204 e lisozima em *Globicephala macrorhynchus* e *Grampus griseus* (KAWASHIMA et al., 2004c; KOMOHARA et al., 2006). Paralelamente, macrófagos pulmonares e hepáticos (Células de Kupffer) foram imunomarcados pelos anticorpos humanos anti-CD204 na baleia-bicuda-de-Baird (*Berardius bairdii*), golfinho-pintado-tropical (*Stenella attenuata*), *S. coeruleoalba* e *T. truncatus* (KAWASHIMA et al., 2004a,b).

Anticorpos monoclonais de *T. truncatus* e específicos para a identificação dos antígenos CD2, CD19, CD21 e CD45R, como também para a molécula de adesão integrina β -2, foram produzidos e caracterizados por citometria de fluxo e imunoprecipitação (DE GUISE et al., 1998, 2002, 2004).

E finalmente, também já foram descritas amplas reações cruzadas dos marcadores CD2, CD19, CD21 e CD45R em várias outras espécies de cetáceos (DE GUISE et al., 2002).

O presente estudo analisou a imunoexpressão de 20 anticorpos monoclonais e um policlonal no baço de *P. blainvillei* (Tabelas 1 e 2). Para a imunofenotipagem das células linfóides de *P. blainvillei*, foram utilizados os anticorpos testados e relatados na literatura consultada. Os anticorpos investigados apresentavam especificidade para antígenos de superfície do sistema hematopoiético, incluindo: incluindo células T, células B, histiócitos, MHC II, Cadeia leve Kappa da imunoglobulina, Cadeia leve Lambda da imunoglobulina. Além do mais, anticorpos anti-S100, anti-lisozima, anti-TNF- α , anti-TGF- β e anti-IL-12 também foram testados.

Cinco anticorpos apresentaram imunomarcagem positiva (Tabela 5), incluindo a anti-lisozima (Clone A 0099/ Dako), o anti-S100 (Clone Z 0311/ Dako), anti-MHC II (Clone 171 D3), anti-Cadeia leve Kappa da imunoglobulina (Clone A 0191/ Dako) e anti-Cadeia leve Lambda da imunoglobulina (Clone A 0193/ Dako).

Porém, os marcadores para CD45RO, CD79 α , CD 20, CD3, CD3 ϵ , CD68 e MAC387 não demonstraram reação cruzada (Tabela 5). Estes resultados sugerem que a homologia entre as sequências dos ácidos nucleicos das proteínas (CD45RO, CD79 α , CD 20, CD3, CD3 ϵ , CD68 e MAC387) da *P. blainvillei* com as sequências das outras espécies de animais testados seja pequena, requerendo estudos futuros para a elucidação destes aspectos.

Com base nos resultados obtidos nas reações de imuno-histoquímica realizadas, investigou-se as imunoexpressões pulmonar e esplênica da lisozima, proteínas da família S-100 e das citocinas TGF- β , IL-12 e TNF- α em *P. blainvillei* com e sem processos inflamatórias pulmonares.

Pelo nosso conhecimento, esta é a primeira avaliação para essas proteínas em uma espécie de mamífero marinho do Atlântico Sul.

7.2 Imunoexpressão das citocinas

As citocinas são polipeptídeos secretados e produzidos por vários tipos celulares. Possuem funções autócrina, parácrina ou endócrina para regular as respostas imune e inflamatória (MOLDOVEANU et al., 2009).

Estas moléculas podem ser classificadas em pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e INF- γ , ativam o sistema imune e participam da resposta inflamatória aguda. Dentre as citocinas anti-inflamatórias, destacam-se a IL-10 e TGF- β (MOLDOVEANU et al., 2009).

Acredita-se que as citocinas tenham um papel importante no recrutamento, proliferação e sobrevivência de células inflamatórias em doenças pulmonares de mamíferos (MURO et al., 2001); sendo assim, estudos têm sido realizados para investigar a expressão destas moléculas, a fim de compreender melhor as funções do sistema imunológico em cetáceos.

Recentemente, pesquisadores utilizaram a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar e quantificar o RNA mensageiro (RNAm) das citocinas IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α e TGF- β em *P. phocoena* (BEINEKE et al., 2004; FONFARA et al., 2007).

Beineke et al. (2007a) avaliaram os níveis de mRNA da IL-10 no sangue de *P. phocoena* que apresentavam enfermidades crônicas, incluindo pneumonias, serosites, miocardites e dermatites. Uma significativa regulação positiva (*up-regulation*) da IL-10 foi encontrada predominantemente nos indivíduos com condição sanitária ruim e com evidência de infecções bacterianas crônicas. As demais citocinas não mostraram correlações positivas, seja com a condição sanitária do animal, seja com a depleção linfóide observada.

Ademais, a técnica RT-PCR foi empregada para detectar a expressão gênica das IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-18, TNF- α e TGF- β e IFN- γ , e avaliar a função leucocitária nos Golfinhos-de-laterais-brancas-do-Pacífico (*L. obliquidens*), *T. truncatus* e em *D. leucas* (SITT et al., 2008).

A homologia entre estas citocinas dos cetáceos e ungulados é alta. Por outro lado, as citocinas humana, murina, canina, felina e dos pinípedes demonstraram menor homologia quando comparadas com as citocinas dos cetáceos. Entretanto, regiões moleculares preservadas podem ser encontradas em áreas biologicamente ativas, tais como sítios receptores ligantes das citocinas dos mamíferos marinhos (KING et al., 1996; NESS et al., 1998; SHODA et al., 1998; ST-LAURENT et al., 1999; St-LAURENT; ARCHAMBAULT, 2000; INOUE et al., 2001b; SHOJI et al., 2001; BEINEKE et al., 2004).

A homologia entre as sequências dos ácidos nucleicos das citocinas da *P. phocoena* e sequências de cDNA de outras espécies de mamíferos pode ser visualizada na tabela 14 (BEINEKE et al., 2004). Ressalta-se que, segundo a literatura, a homologia entre determinadas sequências dos ácidos nucleicos de diferentes espécies com valores superiores a 50% é considerada alta (OBUKOSIA et al., 2005).

Tabela 14 – Porcentagem de homologia entre as sequências dos ácidos nucleicos das citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TGF- β , TNF- α) do boto-do-porto (*Phocoena phocoena*) com as sequências de cDNA de outras espécies de mamíferos. Resultados demonstrados em porcentagem (Adaptado de Beineke et al., 2004)

Espécies		Porcentagem de homologia entre ácidos nucleicos					
		IL-2	IL-4	IL-6	IL-10	TGF- β	TNF- α
Golfinho-nariz-de-garrafa	<i>Tursiops truncatus</i>	-	98	-	-	-	98
Baleia-orca	<i>Orcinus orca</i>	98	-	98	98	-	-
Baleia-beluga	<i>Delphinapterus leucas</i>	99	-	97	-	-	100
Cavalo	<i>Equus caballus</i>	86	80	83	91	95	86
Bovino	<i>Bos taurus</i>	86	86	80	91	95	89
Ovino	<i>Ovis aries</i>	86	87	79	92	96	90
Suíno	<i>Sus scrofa</i>	89	85	88	87	96	89
Camundongo	<i>Mus musculus</i>	77	75	77	88	89	89
Lobo-marinho-cinzento	<i>Halichoerus grypus</i>	85	-	-	-	-	-
Foca-do-porto	<i>Phoca vitulina</i>	-	-	77	-	-	-
Cão	<i>Canis familiaris</i>	84	78	80	88	95	86

—: Sequência desconhecida do ácido nucleico

Com base na alta homologia entre as citocinas dos cetáceos e de outras espécies de animais terrestres e aquáticos, e com base nos resultados prévios de padronização imuno-histoquímica (item 7.1), o presente trabalho investigou a imunoexpressão pulmonar e esplênica das citocinas IL-12, TNF- α e TGF- β em *P. blainvillei* sem (Grupo 1/ Controle) e com (Grupo 2) doenças inflamatórias pulmonares. Foram usados os anticorpo anti-IL-12 e TNF- α murino e anti-TGF- β humano (Tabelas 1 e 2).

A análise estatística evidenciou diferença significativa para a expressão das citocinas TGF- β ($p=0,0428$), TNF- α ($p=0,0384$) e IL-12 ($p=0,0331$) nos fragmentos pulmonares entre os animais do G1 e G2 (Tabela 15).

Tabela 15 – Avaliação morfológica para imunoexpressão pulmonar das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* sem (Grupo 1/Controle) e com (Grupo 2) alterações inflamatórias^(1,2)

Anticorpo	G 1	G 2	p
TGF- β	22,5 $\pm$ 16,8 ^a	45,3 $\pm$ 35,1 ^b	$p=0.0428$
TNF- α	13,2 $\pm$ 4,1 ^a	23,3 $\pm$ 12,2 ^b	$p=0.0384$
IL-12	9,7 $\pm$ 5,3 ^a	18 $\pm$ 10,4 ^b	$p=0.0331$

(1) Valores representam o número de células marcadas por mm² (Média $\pm$ S.D.).

(2) Em cada linha, letras sobrescritas diferentes indicam significância entre os Grupos para $p < 0.05$ (Mann-Whitney U Test).

Nos fragmentos esplênicos, por outro lado, não houve diferença estatística com relação à imunoexpressão das citocinas TGF- β ($p=0,4168$), TNF- α ($p=0,3299$) e IL-12 ($p=0,6261$) entre os animais de ambos os grupos (Tabela 16). Estes resultados sugerem que os processos inflamatórios pulmonares observados nos animais do G2 não tiveram manifestação sistêmica significativa a ponto de modular a expressão esplênica das citocinas analisadas. Trabalhos complementares visando correlacionar a expressão esplênica de citocinas com a intensidade dos processos inflamatórios pneumônicos poderão contribuir para o entendimento do papel destas substâncias na fisiopatologia das pneumonias em cetáceos.

Tabela 16 – Avaliação morfológica para imunoexpressão esplênica das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 em *Pontoporia blainvillei* sem (Grupo 1/Controle) e com (Grupo 2) alterações inflamatórias pulmonares^(1,2)

Anticorpo	G 1	G 2	p
TGF- β	164,2 $\pm$ 65,7	193,5 $\pm$ 93,4	$p=0.4168$
TNF- α	49,9 $\pm$ 16,5	43,6 $\pm$ 12,7	$p=0.3299$
IL-12	56,9 $\pm$ 19,9	53,3 $\pm$ 17,8	$p=0.6261$

(1) Valores representam o número de células marcadas por mm² (Média $\pm$ S.D.).

(2) Em cada linha, letras sobrescritas diferentes indicam significância entre os Grupos para $p < 0.05$ (Mann-Whitney U Test).

7.2.1 Imunoexpressões pulmonar e esplênica do TGF- β em *P. blainvillei*

Em nosso trabalho, a imunoexpressão pulmonar do TGF- β (Figuras 20 e 21) diferiu significativamente ($p=0,0428$) entre os dois grupos investigados. Estes resultados estão de acordo com a literatura consultada.

O TGF- β é uma citocina anti-inflamatória e está envolvido no reparo do tecido pulmonar normal após injúria. Segundo pesquisas recentes, utilizando modelos experimentais murinos, o aumento do TGF- β ocorre durante o início dos processos inflamatórios (BARTRAM; SPEER, 2004).

Os pulmões apresentam estratégias órgão-específicas que previnem a inflamação excessiva, principalmente durante processos infecciosos bacterianos. Por exemplo, as células epiteliais pulmonares do Tipo II (Pneumócitos tipo II) se comunicam com os macrófagos alveolares para limitar a intensidade da inflamação induzida pela resposta imune adaptativa. Os macrófagos alveolares secretam citocinas anti-inflamatórias, incluindo o TGF- β , visando diminuir (*down-regulation*) a resposta inflamatória pulmonar (MOORE et al., 1992; TOOSSI et al., 1996).

Deve-se ressaltar que o TGF- β também desempenha um importante papel na morfogênese e função pulmonar normais, bem como na patogênese da doença associada com a fibrose pulmonar em seres humanos (BARTRAM; SPEER, 2004). Esta citocina pode interferir na expressão gênica das moléculas da matrix extracelular nas células estromais para induzir a síntese de colágeno e inibir a produção de colagenase. O TGF- β pode induzir também a produção de outros fatores de crescimento e estimular a proliferação de fibroblastos (PELTON; MOSES, 1990).

Finalmente, sabe-se que os receptores para esta citocina estão virtualmente presentes em todas as células (DING et al., 1993).

Porém, interessante, não foi observada diferença significativa para a imunoexpressão do TGF- β nos fragmentos esplênicos ($p=0,4168$) entre o G1 e G2. De forma semelhante ao que foi discutido no item 7.2, acreditamos que trabalhos futuros poderão esclarecer os motivos dos resultados obtidos.

7.2.2 Imunoexpressões pulmonar e esplênica do TNF- α em *P. blainvillei*

A família do Fator de Necrose Tumoral (TNF) está primariamente envolvida na regulação da proliferação celular e apoptose, mas o TNF- α apresenta propriedades pró-inflamatórias adicionais (TAYAL; KALRA, 2008).

O TNF- α é uma citocina multifuncional que participa na patogênese de várias enfermidades, incluindo as autoimunes, inflamatórias e degenerativas, além do colapso séptico e insuficiência cardíaca congestiva (BAZZONI; BEUTLER, 1996; BOLGER; ANKER, 2000; SINGH; SURUCHI, 2004). Ainda, é a principal citocina reguladora da inflamação aguda, ativando plaquetas e desempenhando função na gênese da febre, anemia e caquexia (BAZZONI; BEUTLER, 1996; O'DELL, 1999).

Segundo Le e Vilcek (1987), de todas as citocinas estudadas, o TNF- α aparece como um dos mais importantes componentes da defesa do hospedeiro mediada por citocinas contra bactérias, incluindo as micobactérias, fungos e parasitas.

No presente trabalho, os resultados observados no pulmão estiveram de acordo com a literatura consultada. A imunoexpressão pulmonar do TNF- α também apresentou diferença (Figuras 24 e 25) significativa ($p=0,0384$) entre os animais pertencentes ao G1 e G2.

Destaca-se que agregados bacterianos foram observados no parênquima pulmonar de 15,4% (4/26) dos animais no G2 (BP 44, BP 111, IPEC 095, MOCA 208). Além do mais, segundo Ruoppolo (2003), a cultura microbiológica de fragmentos pulmonares foi realizada em um animal (1/26; 3,85%) do G2 (BP 31), na qual isolou-se *Staphylococcus* spp.

Sendo assim, acreditamos que o aumento da expressão do TNF- α observada nos animais do G2 está associado às alterações inflamatórias pulmonares e à presença dos agentes bacterianos intralesionais, observada em parcela dos animais investigados.

Por outro lado, de forma semelhante ao TGF- β , não foi observada diferença significativa para a imunoexpressão do TNF- α nos fragmentos esplênicos ($p= 0.3299$) entre o G1 e G2. Trabalhos futuros buscarão elucidar este fenômeno.

7.2.3 Imunoexpressão pulmonar e esplênica da IL-12 em *P. blainvillei*

A IL-12 é produzida em resposta a inúmeros estímulos inflamatórios e infecciosos (WOLF et al., 1991). Desta forma, esta citocina desenvolve uma

importante função tanto na imunidade adquirida quanto nos mecanismos de resistência inatos do hospedeiro, uma vez que induz a produção de IFN- γ pelas células NK na fase inicial da resposta imune, que por sua vez, está envolvido na diferenciação das células Th1, importantes nas respostas anti-infecciosas e anti-tumorais (TRINCHIERI, 2003).

Storkus et al. (1998) relatam que a IL-12 promove a imunidade mediada por células Th1, sendo relevante na ação contra doenças infecciosas, oncogênese e corpos estranhos.

Finalmente, a IL-12 também está intimamente associada aos processos inflamatórios granulomatosos. A formação do granuloma é um processo complexo, que requer a atração, adesão e ativação local de leucócitos, envolvendo as respostas imunes inata e adaptativa. Sabe-se que diversas citocinas, incluindo a IL-12, participam destes fenômenos (CHENSUE; KINKEL, 2003).

Em nosso trabalho, a imunoexpressão pulmonar da IL-12 foi significativamente maior ($p=0,0331$) nos animais com alterações inflamatórias pulmonares (G2).

Além do mais, a pneumonia granulomatosa foi observada em 27% (7/26), dos animais do G2, sendo que em todos estes foram notados diversos cristais de colesterol intralesionais (Figura 11).

Esta condição é frequentemente encontrada em animais de laboratório (BEAVER et al., 1963), silvestres (HAMIR et al., 1996; BROWN, 1988) e domésticos (CASWETT; WILLIAMS, 2007). Os alvéolos apresentam inúmeros macrófagos espumosos intraluminais, podendo estar associados a cristais de colesterol circundados por células gigantes multinucleadas (BEAVER et al., 1963; BROWN, 1988; HAMIR et al., 1996; CASWETT; WILLIAMS, 2007).

Esta alteração é observada com maior frequência em animais clinicamente normais e desta forma, parece ser de natureza incidental (BEAVER et al., 1963; BROWN, 1988). Porém, pode refletir também a resposta celular do animal para infecções parasitárias (BROWN, 1988). Além do mais, muitos casos são idiopáticos, mas alguns são secundários à obstrução das vias aéreas por exsudatos, broncoconstrição e/ou neoplasias, situações que possibilitam o acúmulo de lipídios, tais como o surfactante, no lúmen alveolar (CASWETT; WILLIAMS, 2007).

Contudo, no presente trabalho, não foi possível determinar a origem destas formações no parênquima pulmonar de *P. blainvillei*. Devido a alta incidência deste processo nos animais, sugere-se que estudos sejam desenvolvidos para investigar a fisiopatologia do fenômeno, assim como a eventual implicação para a homeostasia dos animais indivíduos afetados.

Além do mais, corroborando com a literatura científica consultada, é possível sugerir que o aumento da imunoexpressão da IL-12 nos fragmentos pulmonares do G2 esteve associado aos processos inflamatórios granulomatosos decorrentes da presença dos cristais de colesterol intersticiais.

De forma semelhante ao verificado com TGF- β e TNF- α , não foi observada diferença significativa para a imunoexpressão da IL-12 nos fragmentos esplênicos ($p=0.6261$) entre o G1 e G2. Razões para isto não puderam ser identificadas, e requerem trabalhos futuros com vistas à compreensão deste fenômeno.

7.3 Imunoexpressão pulmonar e esplênica da lisozima em *P. blainvillei*

Da mesma forma que as citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12, a imunoexpressão pulmonar da lisozima apresentou diferença significativa ($p=0,0004$) entre G1 e G2 (Figuras 12 e 13).

Esta proteína está presente nos neutrófilos, macrófagos, monócitos e células epiteliais (GANZ, 2002), e representa um importante agente antimicrobiano, particularmente contra bactérias Gram-positivas (BOYTON; OPENSHAW, 2002). Segundo Skerrett (2004), a característica mais reconhecida da lisozima é sua atividade bacteriolítica.

Em nosso trabalho, 15,4% (4/26) dos animais do G2 (BP 44, BP 111, IPEC 095 e MOCA 208) demonstraram agregados bacterianos no interstício pulmonar. Além do mais, segundo Ruoppolo (2003), em um animal (1/26; 3,85%) do G2 (BP 31), o *Staphylococcus* spp foi isolado de fragmentos pulmonares colhidos à necropsia.

A maior expressão pulmonar da lisozima observada nos animais com alterações inflamatórias pulmonares (G2) está de acordo com a literatura, uma vez

que a lisozima é o polipeptídeo antimicrobiano mais abundante nas secreções das vias respiratórias e seus níveis aumentam consideravelmente nos locais de inflamação (GANZ, 2002).

Por outro lado, para esta proteína, semelhantemente ao observado com as substâncias acima discutidas, não houve diferença estatística ($p=0,0525$) para a imunoexpressão esplênica entre os grupos investigados.

7.4 Imunoexpressão pulmonar e esplênica das proteínas da família S100 em *P. blainvillei*

No presente trabalho, observou-se diferença estatística nas expressões pulmonar ($p=0,0370$) e esplênica ($p=0,0135$) da proteína S100 entre os dois grupos, exibindo maior expressão nos animais do G2 (Figuras 16, 17, 18 e 19), ou seja, nos indivíduos que apresentaram alterações inflamatórias pulmonares. Estes resultados corroboram as publicações de modelos murinos experimentais existentes na área (HOFMANN et al., 1999).

As proteínas da família S100 estão relacionadas a várias atividades celulares inflamatórias e têm sido implicadas na regulação da fosforilação protéica, na dinâmica dos componentes do citoesqueleto, homeostasia do Ca^{2+} , atividades enzimáticas, fatores de transcrição e no crescimento e diferenciação celulares (DONATO, 2001).

Algumas funções extracelulares das proteínas S100 estão relacionadas com mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos, incluindo atividades antibacterianas (COLE et al., 2001) e antiparasitárias (MOROZ et al., 2003).

Além destas funções associadas à defesa do hospedeiro, as principais características das proteínas da família S100 estão relacionadas aos mecanismos pró-inflamatórios. Foell et al. (2004) observaram a elevação significativa da concentração destas proteínas em seres humanos acometidos por processos inflamatórios vasculares.

Desta forma, os resultados obtidos em nosso trabalho indicam que a família de proteínas S-100 também participa ativamente da modulação do processo inflamatório pulmonar em *P. blainvillei*. O modo de como esta modulação ocorre ainda carece de investigações mais detalhadas.

7.5 Avaliação do grau de depleção linfóide esplênica em *P. blainvillei*

Beineke et al. (2005) avaliaram a associação entre o grau de depleção dos tecidos linfóides e a condição sanitária dos animais da espécie *P. phocoena*, uma vez que alterações no timo e baço podem ser induzidas primariamente por poluentes, ou ser conseqüentes às doenças infecciosas.

Ainda, a depleção linfóide dos animais pesquisados por aqueles autores esteve associada com elevadas concentrações de PBDE, produtos utilizados como retardantes de chamas em equipamentos eletrônicos, plásticos, tecidos, materiais de construção, carpetes veículos, aviões e etc (BAIRD, 2002; BRAGA et al., 2002).

Contudo, no trabalho acima não foi observada correlação com o *status* sanitário e condição corporal dos animais, suportando a hipótese de imunodeficiência induzida por contaminantes

Em nosso trabalho, o tamanho médio das polpas brancas foram mensurados nos baços dos animais pertencentes aos grupos G1 e G2. A análise estatística empregada não demonstrou diferença significativa ($p=0,2779$) entre as áreas das polpas brancas esplênicas dos animais dos grupos pesquisados (Tabelas 10 e 11).

Em seguida, o grau de depleção linfóide esplênica de cada animal foi determinado baseando-se na classificação proposta por Beineke et al. (2007b). Com relação aos animais do G1, 25% (2/8) apresentaram baço normal (Grau I). As depleções esplênicas discreta (Grau II) e intensa (Grau IV) foram observadas em 62,5% (5/8) e 12,50% (1/8) dos animais, respectivamente. Em nenhum animal pertencente ao G1 notou-se depleção esplênica moderada (Grau III).

De forma semelhante ao G1, a depleção linfóide esplênica discreta (Grau II) foi predominante no G2 e esteve presente em 53,8% (14/26) dos animais. Ademais, 11,5% (3/26) e 7,8% (2/26) demonstram depleções linfóides moderada (Grau III) e

intensa (Grau IV), respectivamente. E, finalmente, sete (26,9%) animais do G2 apresentaram baço normal (Grau I).

Acredita-se que diversos fatores podem interferir no desenvolvimento, maturação e funcionalidade do sistema linfóide dos vertebrados, destacando-se dentre estes a contaminação ambiental por organoclorados (BEINEKE et al., 2009).

Dentre os 34 animais utilizados no presente trabalho, as concentrações de pesticidas organoclorados foram investigadas em 23,5% (8/34) dos indivíduos durante um estudo prévio realizado (ALONSO, 2008). Em sua pesquisa, Alonso (2008), objetivou avaliar a ocorrência de organoclorados em amostras de gordura subcutânea de 53 *P. blainvillei* obtidas na região costeira do Estado de São Paulo.

As concentrações de pesticidas organoclorados associadas aos graus de depleção linfóide demonstrados por estes indivíduos estão presentes na tabela 17.

Tabela 17 – Distribuição das concentrações médias de pesticidas organoclorados em *Pontoporia blainvillei*, de acordo com o sexo, faixa etária e intensidade de depleção linfóide esplênica. Resultados expressos em ng.g^{-1} lipídios¹

ANIMAL	SEXO	FAIXA ETÁRIA	GRAU DE DEPLEÇÃO LINFÓIDE ESPLÊNICA	Σ PCB's	Σ DDT's	Σ HCH's	Σ CHL's	HCB
BP 13	M	Jovem	IV	19537	3883	12,9	67,4	65,7
BP 44	F	Adulto	II	2322	637	NR	NR	14,8
BP 45	F	NR	III	3137	755	NR	11,8	15,5
BP 56	M	Jovem	II	6128	1120	21,4	24,5	16,7
BP 136	M	Adulto	III	42185	7186	5,0	98,1	51,5
BP 146	F	Filhote	II	2412	441	NR	8,3	15,3
BP 152	F	Adulto	I	2971	424	45,7	6,2	4,4
BP 153	F	Adulto	I	3068	573	NR	NR	3,3

¹Resultados toxicológicos originalmente publicados por ALONSO, 2008.

M: Macho; F: Fêmea; NR: Não reportado

SP-C: Litoral central do Estado de São Paulo

Σ PCB's (Bifenil policlorado): Compreende a soma de 51 PCB's quantificados pela autora.

Σ DDT's (Dicloro difenil tricloroetano): Compreende a soma de *o,p'*-DDT, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDD, *p,p'*-DDD, *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDE.

Σ HCH's (Hexaclorociclohexano): Compreende a soma dos isômeros α -HCH, β -HCH, γ -HCH (lindano) e δ -HCH.

Σ CHL's (Clordanas): Compreende a soma de heptacloro, γ -clordana (gama-clordana ou g-clordana) e oxiclordana.

HCB: Hexaclorobenzeno

Nota-se que a depleção linfóide discreta (Grau II) foi predominante, sendo observada em 37,5% (3/8) dos indivíduos. Por outro lado, 25% (2/8) demonstraram depleção linfóide moderada (Grau III). A depleção linfóide intensa foi encontrada em apenas 12,5% (1/8) dos animais. Finalmente, o baço normal foi visualizado em 25% (2/8) dos animais analisados.

Alonso (2008) também afirma que todas as concentrações de organoclorados apresentaram valores maiores nos machos, em comparação com as fêmeas de mesma maturidade sexual. Estes dados corroboram com os graus de depleção linfóide esplênica observados em nosso trabalho, uma vez que os machos apresentaram maiores graus de depleção esplênica (Tabela 17).

Os dados acima correlacionados sugerem que, para este grupo de 8 animais em particular, a depleção linfóide esplênica possivelmente esteve associada às elevadas concentrações de pesticidas organoclorados observados no tecido adiposo subcutâneo destes animais. cremos que estes dados, por um lado instigantes e por outro preocupantes, merecem análise mais detalhada em futuros projetos.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho avaliou as imunoexpressões das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e proteínas S-100 e lisozima em amostras pulmonar e esplênica de 34 animais da espécie *P. blainvillei* arquivadas junto ao Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos - BTMM - do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens - LAPCOM - do Departamento de Patologia - VPT - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ - da Universidade de São Paulo - USP; evidenciando desta forma, a importância da manutenção destes bancos de tecidos para a realização de trabalhos retrospectivos.

Os resultados alcançados em nosso trabalho mostram a importância de se continuar investigando aspectos inerentes à resposta imune dos mamíferos marinhos, principalmente quando associado às alterações do sistema respiratório, já que os processos pneumônicos estão entre as mais relevantes alterações patológicas encontradas em mamíferos marinhos investigados junto ao LAPCOM.

E finalmente, apesar de tratar-se de dados ainda preliminares, observou-se uma possível associação entre elevadas concentrações de organoclorados no tecido adiposo subcutâneo de parcela dos exemplares de *P. blainvillei* estudados na presente investigação e a ocorrência de depleção linfóide esplênica nestes animais, ressaltando a importância de uma análise mais detalhada em futuros projetos.

9 CONCLUSÕES

- Os anticorpos testados (Tabela 1) para anti-MHC II, anti-S100, anti-lisozima, Cadeia leve Kappa da imunoglobulina, Cadeia leve Lambda da imunoglobulina, TNF- α , TGF- β e IL-12 apresentam reação cruzada para as células de *P. blainvillei*, o que sugere haver elevada homologia entre as sequências dos ácidos nucléicos destas proteínas de *P. blainvillei* com as respectivas sequências utilizadas e oriundas de outras espécies de mamíferos.
- De forma, oposta, os anticorpos testados (Tabela 1) para CD45RO, CD79 α , CD 20, CD3, CD3 ϵ , CD68 e MAC387 não demonstram reação cruzada para as células de *P. blainvillei*, o que sugere haver baixa homologia entre as sequências dos ácidos nucléicos destas proteínas de *P. blainvillei* com as respectivas sequências utilizadas e oriundas de outras espécies de mamíferos, requerendo estudos futuros para a elucidação destes aspectos.
- Semelhantemente ao observado em outras espécies de mamíferos, os nossos dados demonstram que as *P. blainvillei* pertencentes ao G2 apresentam imunoexpressão pulmonar das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e proteínas S-100 e lisozima significativamente maior que os animais do G1. Tais resultados corroboram os dados disponíveis na literatura, indicando que a *P. blainvillei* apresenta citocinas com funções semelhantes às encontradas em outros mamíferos.
- Em nosso trabalho, evidenciamos que as *P. blainvillei* pertencentes ao G2 não apresentam imunoexpressão esplênica das citocinas TGF- β , TNF- α e IL-12 e da proteína lisozima significativamente maior que os animais do G1. Estudos mais detalhados, incluindo aqueles relacionados com os métodos utilizados, são necessários para a adequada compreensão destes resultados.
- Concordando com a literatura científica consultada, as *P. blainvillei* pertencentes ao G2 apresentam imunoexpressão esplênica da proteína S100

significativamente maior que os animais do G1, uma vez que as principais características destas proteínas estão relacionadas aos mecanismos pró-inflamatórios.

- Correlacionando nossos dados com os de ALONSO (2008), observamos aparente associação entre elevadas concentrações de organoclorados no tecido adiposo subcutâneo de parte dos exemplares de *P. blainville* utilizados em nosso projeto e a depleção linfóide esplênica nestes animais. cremos que estes dados preliminares, por um lado instigantes e por outro preocupantes, merecem análise mais detalhada em futuros projetos.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, M. B. **Organoclorados em toninhas, *Pontoporia blainvillei* (MAMMALIA: CETACEA) da região costeira do Estado de São Paulo, Brasil.** 2008. 97 f. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Química e Geológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ANDRESDOTTIR, V.; MAGNADOTTIR, B.; ANDRESSON, O. S.; PETURSSON, G.. Subclasses of IgG from whales. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 11, n. 4, p. 801–806, 1987.
- BAIRD, C. **Química Ambiental.** Tradução de Maria Angeles Lobo Recio e Luis Carlos Marques Carrera. 2. ed. Porto Alegre: Editora Bookman, 2002. 622 p.
- BARTRAM, U.; SPEER, C. P. The role of transforming growth factor β in lung development and disease. **Chest**, v. 125, n. 2, p. 754-765, 2004.
- BAZZONI, F.; BEUTLER, B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. **The New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 26, p. 1717–1725, 1996.
- BEAVER, D. L.; ASHBURN, L. L.; MCDANIEL, E. C.; BROWN, N. D. Lipid deposits in the lungs of germ-free animals. **Archives of Pathology**, v. 76, p. 565-570, 1963.
- BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; BAUMGARTNER, W. Das Immunsystem der marinen Säugetiere. Teil 1: Immunantwort, Zytokine und Immuntoxizität. **Tierärztliche Praxis**, v. 34, p.118-126, 2006.
- BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; MCLACHLAN, M.; BRUHN, R.; THRON, K.; FAILING, K.; MULLER, G.; BAUMGARTNER, W. Investigations of the potential influence of environmental contaminants on the thymus and spleen of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 11, p. 3933–3938, 2005.
- BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; MULLER, G.; BAUMGARTNER, W. Increased blood interleukin-10 mRNA levels in diseased free-ranging harbor porpoises (*Phocoena phocoena*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, n. 1/2, p. 100–106, 2007a.
- BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; STOTT, J.; MULLER, G.; BAUMGARTNER, W. Phenotypical characterization of changes in thymus and spleen associated with lymphoid depletion in free-ranging harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 117, n. 3-4, p. 254–265, 2007b.
- BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; VAN ELK, N.; BAUMGARTNER, W. Development of a lymphocyte-transformation-assay for peripheral blood lymphocytes of the harbor porpoise and detection of cytokines using the reverse-transcription polymerase chain reaction. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 98, n. 1-2, p. 59–68, 2004.

BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; WOHLSEIN, P.; BAUMGARTNER, W. Immunology of whales and dolphins. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 2009. No prelo. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19700205>>. Acesso em: 12 set. 2009.

BEINEKE, A.; SIEBERT, U.; WUNSCHMANN, A.; STOTT, J. L.; PRENGEL, I.; KREMMER, E.; BAUMGARTNER, W. Immunohistochemical investigation of the cross-reactivity of selected cell markers from various species for characterization of lymphatic tissues in the harbour porpoise (*Phocoena phocoena*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 125, n. 4, p. 311–317, 2001.

BERTOZZI, C. P.; ZERBINI, A. N. Incidental mortality of franciscana, *Pontoporia blainvillei*, in the artisanal fishery of Praia Grande, São Paulo State, Brazil. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, n. 1, v. 1, p. 153-160, 2002.

BOLGER, A. P.; ANKER, S. D. Tumor necrosis factor in chronic heart failure: A peripheral view on pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic implications. **Drugs**, v. 60, n. 6, p. 1245–1257, 2000.

BOYTON, R. J.; OPENSHAW, P. J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **British Medical Bulletin**, v. 61, n. 1, p. 1–12, 2002.

BRAGA, B.; HESPANHOL, I.; CONEJO, J. G. L.; BARROS, M. T. L.; SPENCER, M.; PORTO, M.; NUCCI, N.; JULIANO, N.; EIGER, S. **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo: Prentice Hall, 2002. 305 p.

BROWN, C.C. Endogenous lipid pneumonia in opossums from Louisiana. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 2, p. 214-219, 1988.

CASWETT, J. L.; WILLIAMS, K. J. Respiratory system. In: MAXIE, M. G. (Ed.). **Jubb, kennedy, and palmer's pathology of domestic animals**. 5. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007. v. 2, p. 523-653.

CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H. A.; WOLF, S. F.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. **Journal of Experimental Medicine**, v. 173, n. 4, p. 869-879, 1991.

CHENSUE, S. W.; KINKEL, S. L. Cytokines and chemokines in granulomatous inflammation. In: BOROS, D. L. (Ed.). **Granulomatous infections and inflammations**: cellular and molecular mechanisms. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2003. p. 29-64.

COLE, A. M.; LIAO, H. I.; STUCHLIK, O.; TILAN, J.; POHL, J.; GANZ, T. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. **Journal of Immunology**, v.169, n. 12, p. 6985-6991, 2002.

COLE, A. M.; KIM, Y. H.; TAHK, S.; HONG, T.; WEIS, P.; WARING, A. J.; GANZ, T. Calcitermin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions. **FEBS Letters**, v. 504, n. 1/2, p. 5-10, 2001.

COWAN, D. F.; SMITH, T. L. Morphology of complex lymphoepithelial organs of the anal canal ("anal tonsil") in the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Journal of Morphology**, v. 223, n. 3, p. 263–268, 1995.

COWAN, D. F.; SMITH, T. L. Morphology of the lymphoid organs of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*. **Journal of Anatomy**, v. 194, p. 505–517, 1999.

CRESPO, E. A.; HARRIS, G. Comentários sobre el limite sur de la distribución de la franciscana (*Pontoporia blainvillei*) y su tamaño de manada. In: REUNION DE ESPECIALISTAS EN MAMÍFEROS ACUATICOS DE AMERICA DEL SUR, 5., 1992, Buenos Aires. **Resúmenes...** Buenos Aires: Fundacion Australis, Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, 1992. p. 18.

CRESPO, E. A.; HARRIS, G.; GONZÁLEZ, R. Group size and distributional range of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. **Marine Mammal Science**, v. 14, n. 4, p. 845–849, 1998.

DANILEWICZ, D.; CLAVER, J. A.; CARRERA, A. L. P.; SECCHI, E. R.; FONTOURA, N. F. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvillei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Fishery Bulletin**, v. 102, p. 581–592, 2004.

DE GUISE, S.; ERICKSON, K.; BLANCHARD, M.; DIMOLFETTO, L.; LEPPER, H.; WANG, J.; STOTT, J. L.; FERRICK, D. S. Characterization of a monoclonal antibody that recognizes a lymphocyte surface antigen for the cetacean homologue to CD45R. **The Journal of Immunology**, v. 94, n. 2, p. 207–212, 1998.

DE GUISE, S.; BERNIER, J.; DUFRESNE, M. M.; MARTINEAU, D.; BELAND, P.; FOURNIER, M. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of mitogen-induced blastic transformation of lymphocytes from peripheral blood, spleen and thymus. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 50, n.1/2, p.117-126, 1996.

DE GUISE, S.; BERNIER, J.; MARTINEAU, D.; BELAND, P.; FOURNIER, M. Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 21, n. 5, p. 425–433, 1997.

DE GUISE, S.; ERICKSON, K.; BLANCHARD, M.; DIMOLFETTO, L.; LEPPER, H. D.; WANG, J.; STOTT, J. L.; FERRICK, D. A. Monoclonal antibodies to lymphocyte surface antigens for cetacean homologues to CD2, CD19 and CD21. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 84, n. 3/4, p. 209–221, 2002.

DE GUISE, S.; ERICKSON, K.; BLANCHARD, M.; DIMOLFETTO, L.; LEPPER, H. D.; STOTT, J. L.; FERRICK, D. A. Characterization of F21.A, a monoclonal antibody that recognize a leukocyte surface antigen for killer whale homologue to b-2 integrin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 97, n. 3/4, p. 195–206, 2004.

DE GUISE, S.; FLIPO, D.; BOEHM, J. R.; MARTINEAU, D.; BELAND, P.; FOURNIER, M. Immune functions in beluga whales (*Delphinapterus leucas*): Evaluation of phagocytosis and respiratory burst with peripheral blood leukocytes using flow cytometry. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 47, n. 3/4, p. 351–362, 1995.

DING, L.; LINSLEY, P. S.; HUANG, L. Y.; GERMAIN, R. N.; SHEVACH, E. M. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. **The Journal of Immunology**, v. 51, n. 3, p. 1224–1234, 1993.

DONATO, R. S100: A multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 7, p. 637–668, 2001.

DONATO, R. Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1450, n. 3, p. 191–231, 1999.

ELLISON III, R. T.; GIEHL, T. J. Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. **Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 4, p. 1080–1091, 1991.

ENGEL, M. H.; MARCONDES, M. C. C. Resgate, reabilitação e soltura: Mysticetos. In: REMANE. REDE DE ENCALHE DE MAMÍFEROS AQUÁTICOS DO NORDESTE (Ed.). **Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos**. Recife: IBAMA, 2005. p. 27–40.

FOELL, D.; HERNANDEZ-RODRIGUEZ, J.; SANCHEZ, M.; VOGL, T.; CID, M. C.; ROTH, J. Early recruitment of phagocytes contributes to the vascular inflammation of giant cell arteritis. **The Journal of Pathology**, v. 204, n. 3, p. 311–316, 2004.

FONFARA, S.; SIEBERT, U.; PRANGE, A. Cytokine and acute phase proteins as markers for infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). **Marine Mammal Science**, v. 23, n. 4, p. 931–942, 2007.

GANZ T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, p. 693–697, 2002.

GATELY, M. K.; WILSON, D. E.; WONG, H. L. Synergy between recombinant interleukin 2 (rIL 2) and IL 2-depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses in vitro. **Journal of Immunology**, v. 136, n. 4, p. 1274–82, 1986.

HAMMER, A.S.; KLAUSEN, B.; KNOLD, S.; DIETZ, H.H.; DUTOIT, S.J. Malignant Lymphoma in a West Indian Manatee (*Trichechus manatus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 41, n. 4, p. 834–838, 2005.

HAMIR, N.; HANLON C. A.; RUPPRECHT, C. E. Endogenous lipid pneumonia (multifocal alveolar histiocytosis) in raccoons (*Procyon lotor*) **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, n. 2, p. 267-269, 1996.

HEIZMANN, C. W. The multifunctional S100 protein family. **Methods in Molecular Biology**, v. 172, p. 69–80, 2002.

HOFMANN, M. A.; DRURY, S.; CAIFENG, FU; WU, QU; TAGUCHI, A.; YAN, LU; AVILA, C.; KAMBHAM, N.; BIERHAUS, A.; NAWROTH, P.; NEURATH, M.F.; SLATTERY, T.; BEACH, D.; MCCLARY, J.; NAGASHIMA, M.; MORSER, J.; STERN, D.; SCHMIDT, A. M. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. **Cell**, v. 97, n. 7, p. 889-901, 1999.

HOWARD, E. B.; BRITT, J. O.; MATSUMOTO, G. K.; ITAHARA, R.; NAGANO, C. N. Parasitic diseases. In: HOWARD, E. B. (Ed.). **Pathobiology of marine mammal diseases**. Boca Raton: CRC Press, 1983. v. 1, p. 119-239.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis. **Mamíferos Aquáticos do Brasil. Plano de ação**. 2. ed. Brasília: MMA/IBAMA, 2003. 96 p.

IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis. **Mamíferos aquáticos do Brasil: plano de ação, versão II**. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2001. 96 p.

INOUE, Y.; ITOU, T.; JIMBO, T.; SYOUJI, Y.; UEDA, K.; SAKAI, T. Molecular cloning and functional expression of bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interleukin-1 receptor antagonist. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 78, n. 2, p.131–141, 2001b.

IUCN. **IUCN Red List of Threatened Species**. 2007. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 13 jun. 2008.

JABER, J. R.; FERNANDEZ, A.; HERRAEZ, P.; ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A.; RAMIREZ, G. A.; GARCIA, P. M.; FERNANDEZ, T.; ARBELO, M.; PEREZ, J. Cross-reactivity of human and bovine antibodies in striped dolphin paraffin wax-embedded tissues. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, n. 1/2, p.65–72, 2003a.

JABER, J. R.; PEREZ, J.; ARBELO, M.; HERRAEZ, P.; ESPINOSA DE LOSMONTEROS, A.; RODRIGUEZ, F.; FERNANDEZ, T.; FERNANDEZ, A. Immunophenotypic characterization of hepatic inflammatory cell infiltrates in common dolphins (*Delphinus delphis*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2/3, p. 226–230, 2003b.

JEFFERSON, T. A.; LEATHERWOOD, S.; WEBBER, M. A. **Marine mammals of the world: FAO species identification guide**. Rome: FAO/UNEP, 1993. 320 p.

JEPSON, P. D.; BAKER, J. R.; KUIKEN, T.; SIMPSON, V. R.; KENNEDY, S.; BENNETT, P. M. Pulmonary pathology of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in England and Wales between 1990 and 1996. **Veterinary Record**, v. 146, n. 25, p. 721-728, 2000.

JOHNE, B.; FAGERHOL, M. K.; LYBERG, T.; PRYDZ, H.; BRANDTZAEG, P.; NAESS-ANDRESEN, C. F.; DALE, I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. **Molecular Pathology**, v. 50, n. 3, p. 113, 1997.

JONES, M.; CORDELL, J.L.; BEYERS, A.D.; TSE, A.G.; MASON, D.Y. Detection of T and B cells in many animal species using crossreactive anti-peptide antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 12, p. 5429–5435, 1993.

KAWASHIMA, M.; KUWAMURA, M.; TAKEYA, M.; YAMATE, J. Morphologic characteristics of pulmonary macrophages in cetaceans: particular reference to pulmonary intravascular macrophages as a newly identified type. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 6, p. 682–686, 2004a.

KAWASHIMA, M.; NAKANISHI, M.; KUWAMURA, M.; TAKEYA, M.; YAMATE, J. Distributive and phagocytic characteristics of hepatic macrophages in five cetaceans belonging to Delphinidae and Ziphiidae. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 6, p. 671-80, 2004b.

KAWASHIMA, M.; NAKANISHI, M.; KUWAMURA, M.; TAKEYA, M.; YAMATE, J.; Immunohistochemical detection of macrophages in the short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) and Risso's dolphin (*Grampus griseus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 130, n. 1. p. 32–40. 2004c.

KILBOURN, R. G.; BELLONI, P. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 9, p. 772-776, 1990.

KING, D. P.; SCHRENZEL, M. D.; MCKNIGHT, M. L.; REIDARSON, T. H.; HANNI, K. D.; STOTT, J. L.; FERRICK, D. A. Molecular cloning and sequencing of interleukin 6 cDNA fragments from the harbor seal (*Phoca vitulina*), killer whale (*Orcinus orca*) and Southern sea otter (*Enhydra lutris nereis*). **Journal of Immunogenetics**, v. 43, n. 4, p.190–195, 1996.

KOMADA, T.; ARAKI, R.; NAKATANI K.; YADA I.; NAKA, M.; TANAKA, T. Novel specific chemotactic receptor for S100L protein on guinea pig eosinophils. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 220, n. 3, p. 871-874, 1996.

KOMOHARA, Y.; HIRAHARA, J.; HORIKAWA, T.; KAWAMURA, K.; KIYOTA, E.; SAKASHITA, N.; ARAKI, N.; TAKEYA, M. AM-3K, an anti-macrophage antibody, recognizes CD163, a molecule associated with an anti-inflammatory macrophage phenotype. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 763–771, 2006.

KUMAR, D.; COWAN, D. F. Cross-reactivity of antibodies to human antigens with tissues of the bottlenose dolphin, *Tursiops truncatus*, using immunoperoxidase techniques. **Marine Mammal Science**, v. 10, n. 2, p. 188–194, 1994.

LE, J.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. **Laboratory Investigation**, v. 56, n. 3, p. 234–248, 1987.

LEATHERWOOD, S.; REEVES, R. R. **The sierra club handbook of whales and dolphins**. San Francisco: Sierra Club Books, 1982. 302 p.

LEMARCHAND, P.; VAGLIO, M.; MAUËL, J.; MARKERT, M. Translocation of a small cytosolic calcium-binding protein (MRP-8) to plasma membrane correlates with human neutrophil activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 27, p.19379–19382, 1992.

LUNDQVIST, M. L.; KOHLBERG, K. E.; GEFROH, H. A.; ARNAUD, P.; MIDDLETON, D. L.; ROMANO, T. A.; WARR, G. W. Cloning of the IgM heavy chain of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*), and initial analysis of VH gene usage. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 26, n. 6, p. 551–562, 2002.

MACKAY, F.; LOETSCHER, H.; STUEBER, D.; GEHR, G.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. **Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 5, p. 1277–1286, 1993.

MANCIA, A.; LUNDQVIST, M. L.; ROMANO, T. A.; PEDEN-ADAMS, M. M.; FAIR, P. A.; KINDY, M. S.; ELLIS, B. C.; GATTONI-CELLI, S.; MCKILLEN, D. J.; TRENT, H. F.; CHEN, Y. A.; ALMEIDA, J. S.; GROSS, P. S.; CHAPMAN, R. W.; WARR, G. W. A dolphin peripheral blood leukocyte cDNA microarray for studies of immune function and stress reactions. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 31, n. 1, p. 520– 529, 2007a.

MANCIA, A.; ROMANO, T. A.; GEFROH, H. A.; CHAPMAN, R. W.; MIDDLETON, D. L.; WARR, G. W.; LUNDQVIST, M. L. Characterization of the immunoglobulin A heavy chain gene of the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 3/4, p. 304–309, 2007b.

MARIGO, J. **Patologia comparada das principais enfermidades parasitárias de mamíferos marinhos encontrados na costa sudeste e sul do Brasil**. 2003. 150 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MEAD, J. G. Anatomy of the external nasal passages and facial complex in the Delphinidae (Mammalia: Cetacea). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 207, p.1–72. 1975.

MOLDOVEANU, B.; OTMISHI, P.; JANI, P.; WALKER, J.; SARMIENTO, X.; GUARDIOLA, J.; SAAD, M.; YU, JERRY. Inflammatory mechanisms in the lung. **Journal of Inflammation Research**, v. 2, p. 1–11, 2009.

MOORE, S. A.; STRIETER, R. M.; ROLFE, M. W.; STANDIFORD, T. J.; BURDICK, M. D.; KUNKEL, S. L. Expression and regulation of human alveolar macrophage derived interleukin-1 receptor antagonist. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 6, n. 6, p. 569–575, 1992.

MOREIRA, L. M. P.; SICILIANO, S. Northward extension range for *Pontoporia blainvillei*. In: BIENNIAL CONFERENCE ON THE BIOLOGY OF MARINE MAMMALS, 9., 1991. Chicago, EUA. **Resumos...** 1991. p. 48.

MORETTIN, P. A.; BUSSAD, W. O. **Estatística básica**. 5. ed. São Paulo: Saraiva, 1996. 526 p.

MOROZ, O. V.; ANTON, A. A.; GRIST, S. J.; MAITLAND, N. J.; DODSON, G. G.; WILSON, K. S.; LUKANIDIN, E.; BRONSTEIN, I. B. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 59, p. 859–867, 2003.

MURO, S.; TAHA, R.; TSICOPOULOS, A.; OLIVENSTEIN, R.; TONNEL, A. B.; CHRISTODOULOPOULOS, P.; WALLAERT, B.; HAMID, Q. Expression of IL-15 in inflammatory pulmonary diseases. **Journal of Allergy & Clinical Immunology**, v. 108, n. 6, p. 970-975, 2001.

NAKAMINE, H.; NAGATA, S.; YONEZAWA, M.; TANAKA, Y. The whale (*Odontoceti*) spleen: a type of primitive mammalian spleen. **Kaibogaku Zasshi**, v. 67, n. 2, p. 69–82. 1992.

NASH, D. R.; MACH, J. Immunoglobulin classes in aquatic mammals. Characterization by serologic cross-reactivity, molecular size and binding of human free secretory component. **Journal of Immunology**, v. 107, n. 5, p. 1424–1431, 1971.

NAUME, B.; GATELY, M. K.; DESAI, B. B.; SUNDAN, A.; ESPEVIK, T. Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. **Cytokine**. v. 5, n. 1, p. 38-46, 1993.

NESS, T. L.; BRADLEY, W. G.; REYNOLDS, J. E.; ROESS, W. B. Isolation and expression of the interleukin-2 gene from the killer whale, *Orcinus orca*. **Marine Mammal Science**, v. 14, n. 3, p. 531–543, 1998.

NETTO, R. F.; BARBOSA, L. A. Cetaceans and fishery interactions along the Espírito Santo State, southeastern Brazil during 1994–2001. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 2, p. 57–60, 2003. Número especial.

NEWTON, R. A.; HOGG, N. The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the $\beta 2$ integrin Mac-1 on neutrophils. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 1427–1435, 1998.

NORBERTO, G. O.; MARCONDES, M. C. C.; MAIA-NOGUEIRA, R. Resgate, reabilitação e soltura: Odontocetos. In: REMANE. REDE DE ENCALHE DE MAMÍFEROS QUÁTICOS DO NORDESTE (Ed.). **Protocolo de conduta para encalhes de mamíferos aquáticos**. Recife: IBAMA, 2005. p. 41-63.

OBUKOSIA, S. D.; BOYER, C. D.; RICHARDS, C. M. Restriction mapping of Cucurbitae Pepo L. chloroplast DNA PstI 9.8 kb fragment and detection of ORF 2280 transcripts. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 1-8, 2005.

PABST, D. A.; ROMMEL, S. A.; MCLELLAN, W. A. Functional anatomy of marine mammals. pp. 15-72. In: REYNOLDS III, J. E.; ROMMEL, S. A. (Ed.). **Biology of marine mammals**. Washington, DC.: Smithsonian Institution Press, 1999.

PELTON, R. W.; MOSES, H. L. The beta-type transforming growth factor. Mediators of cell regulation in the lung. **American Review of Respiratory Disease**, v. 142, pt. 2, p. S31-S35, 1990.

PINEDO, M. C.; ROSAS, F. C. W.; MARMONTEL, M. **Cetáceos e pinípedes do Brasil: Uma revisão dos registros e guia para identificação das espécies**. Manaus: UNEP/FUA, 1992. 213 p.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. **Laboratory methods in histotechnology**. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 279 p.

PULSEN, S. M.; ENGSTAD, R. E.; ROBERTSEN, B. Enhanced lysozyme production in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages treated with yeast beta-glucan and bacterial lipopolysaccharide. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 11, n. 1, p. 23-27, 2001.

REEVES, R. R.; SMITH, B. D.; CRESPO, E. A.; NORTABARTOLO, G. D. Dolphins, Whales and Porpoises: 2004-2010 Conservation Action Plan for the World's Cetaceans. Cambridge, UK.: IUCN/SSC Cetacean Specialist Group. 2003. 139 p.

ROMANO, T.; RIDGWAY, S.; QUARANTA, V. MHC class II molecules and immunoglobulins on peripheral blood lymphocytes of the bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 263, n. 1, p. 96-104, 1992.

ROMMEL, S. A.; COSTIDIS, A. M.; FERNÁNDEZ, A.; JEPSON, P. D.; PABST, D. A.; MCLELLAN, W. A.; HOUSER, D. S.; CRANFORD, T. W.; VAN HELDEN, A. L.; ALLEN, D. M.; BARROS, N. B. Elements of beaked whale anatomy and diving physiology and some hypothetical causes of sonar-related stranding. **Journal of Cetacean Research and Management**, v. 7, n. 3, p. 189-209, 2006.

ROMMEL, S. A.; LOWENSTEIN, L. J. Gross and microscopic anatomy of marine mammals. In: DIERAUF, L. A.; GULLAND, F. M. D. (Ed.). **CRC Handbook of Marine Mammal Medicine**. 2. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2001. p. 129-63.

ROSAS, F.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; OLIVEIRA, M. R. de Incidental catches of franciscana (*Pontoporia blainvillei*) on the southern coast of São Paulo State and the coast of Paraná State, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 1, n.1, p.161-167, 2002. Número especial.

RUOPPOLO, V. **Patologia comparada de cetáceos e pinípedes**. 2003. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SÁ, L. R. M. **Síndrome do emagrecimento progressivo dos calitriquídeos – processo semelhante à doença celíaca humana – caracterização clínica, laboratorial e anatomopatológica**. 2004. 186 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SCHÄFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: Functions and pathology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 21, n. 4, p.134-140 1996.

SECCHI, E. R.; OTT, P. H.; DANILEWICZ, D. Report of the fourth workshop for the coordinated research and conservation of the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) in the western South Atlantic. **The Latin American Journal of Aquatic Mammals**, v. 1, p. 11-20. 2002. Número especial.

SEDGWICK, J.D.; RIMINTON, D.S.; CYSTER, J.G.; KÖRNER, H. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. **Immunology Today**, v. 21, n. 3, p.110-113, 2000.

SHIRAI, K.; SAKAI, T.; FUKUDA, M.; OIKE, T. A monoclonal antibody against dolphin lymphocytes (6E9) which recognizes bovine MHC class II antigens. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 3, p. 291–293, 1998.

SHODA, L. K.; BROWN, W. C.; RICE-FICHT, A. C. Sequence and characterization of phocine interleukin 2. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 34, n. 1, p. 81–90, 1998.

SHOJI, Y.; INOUE, Y.; SUGISAWA, H.; ITOU, T.; ENDO, T.; SAKAI, T. Molecular cloning and functional characterization of bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) tumor necrosis factor alpha. **Veterinary Immunology & Immunopathology**, v. 82, n. 3/4, p.183–192, 2001.

SICILIANO, S.; DI BENEDITTO, A. P. M.; RAMOS, R. M. A. A. Toninha pontoporia blainvillei nos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo, costa sudeste do Brasil: caracterização dos habitats e fatores de isolamento das populações. **Boletim do Museu Nacional**, v. 476, p.1-15. 2002.

SINGH, J.; SURUCHI, A. Anti TNF- α strategy: present status of this therapeutic paradigm. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 1, p.10–14, 2004.

SITT, T.; BOWEN, L.; BLANCHARD, M. T.; SMITH, B. R.; GERSHWIN, L. J.; BYRNE, B. A.; STOTT, J. L. Quantitation of leukocyte gene expression in cetaceans. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 11, p. 1253–1259, 2008.

SKERRETT, S. J. Lysozyme in pulmonary host defense: new tricks for an old dog. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 169, n. 4, p. 435–436, 2004.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. **Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 5, p. 1017–1021, 1992.

ST-LAURENT, G.; ARCHAMBAULT, D. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) interleukin 6. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 1, p. 31–44, 2000.

ST-LAURENT, G.; BELIVEAU, C.; ARCHAMBAULT, D. Molecular cloning and phylogenetic analysis of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) and grey seal (*Halichoerus grypus*) interleukin 2. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 67, n. 4, p. 385–394, 1999.

STORKUS, W. J.; TAHARA, H.; LOTZE, M. T. Interleukin-12. In: THOMSON, A. W.; (Ed.). **The cytokine handbook**. 3. ed. Londres: Academic Press. 1998. p. 197–228.

STOSKOPF, S. K. Immunology of marine mammals. In: DIERAUF, L. A. (Ed.). **Handbook of marine mammal medicine: health, diseases and rehabilitation**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1990. p. 89–96.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H.; GOEDDEL, D. V. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signal cell death. **Cell**, v. 74, n. 5, p. 845–853, 1993.

TAYAL, V.; KALRA, B. S. Cytokines and anti-cytokines as therapeutics - an update. **European Journal of Pharmacology**, v. 579, n. 1/3, p. 1–12, 2008.

TAYLOR, B. C.; CHOI, K. Y.; SCIBIENSKI, R. J.; MOORE, P. F.; STOTT, J. L. Differential expression of bovine MHC class II antigens identified by monoclonal antibodies. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 53, n. 5, p. 479–489, 1993.

TOOSSI, Z.; HIRSCH, C. S.; HAMILTON, B. D.; KNUTH, C. K.; FRIEDLANDER, M. A.; RICH, E. A. Decreased production of TGF-beta 1 by human alveolar macrophages compared with blood monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 9, p. 3461–3468, 1996.

TRAVIS, J. C.; SANDERS, B. G. Whale immunoglobulins. II. Heavy chain structure. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 43, n. 3, p. 637–641, 1972.

TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 3, p. 133–146, 2003.

VAN OBBERGHEN-SCHILLING, E.; ROCHE, N.S.; FLANDERS, K.C.; SPORN, M.B.; ROBERTS, A.B. Transforming growth factor beta 1 positively regulates its own expression in normal and transformed cells. **Journal of Biological Chemistry**. v. 263, n. 16, p.7741-6, 1988.

VARELLA, P. P. V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. v. 24, n. 4, p. 146-154, 2001.

WOLF, S. F.; TEMPLE, P. A.; KOBAYASHI, M.; YOUNG, D.; DICIG, M.; LOWE, L.; DZIALO, R.; FITZ, L.; FERENZ, C.; HEWICK, R. M. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. **The Journal of Immunology**, v. 146, n. 9, p. 3074–3081, 1991.

ZABKA, T. S.; ROMANO, T. A. Distribution of MHC II (+) cells in skin of the Atlantic bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*): an initial investigation of dolphin dendritic cells. **The Anatomical Record**, v. 273, n. 1, p. 636–647, 2003.

ZEH, H. J.; TAHARA, H.; LOTZE, M. T. Interleukin-12. In: THOMSON, A. W. (Ed.). **The cytokine handbook**. 2. ed. New York: Academic Press, 1994. p. 239-256.

ANEXO A - Relação dos casos de *Pontoporia blainvillei* mantidos pelo Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos - LAPCOM - e selecionados para o desenvolvimento do projeto, distribuídos em função do número de tombo, sexo, faixa etária, maturidade sexual, peso, comprimento, origem, local e data de necropsia - São Paulo - 2008

N	NÚMERO DO TOMBO	SEXO	FAIXA ETÁRIA ¹	MATURIDADE SEXUAL ²	PESO (Kg)	CT (cm)	ORIGEM	LOCAL	DATA
1	BP 12	F	Adulto	Maduro	21	130	Captura	SP-C	Agosto/2000
2	BP 13	M	Jovem	Maduro	15	117	Captura	SP-C	Março/2001
3	BP 31	M	Jovem	Imaturo	8,2	93	Captura	SP-C	Maió/2001
4	BP 44	F	Adulto	NR	N.R.	N.R.	Captura	SP-C	Julho/2003
5	BP 45	F	NR	Imaturo	N.R.	64	Encalhe	SP-C	Novembro/2003
6	BP 56/ MA 002	M	Jovem	Imaturo	N.R.	110	Captura	SP-C	Fevereiro/2004
7	BP 111	F	NR	Imaturo	N.R.	95	Captura	SP-C	Setembro/2005
8	BP 136	M	Adulto	Maduro	N.R.	114	Captura	SP-C	Junho/2006
9	BP 141	M	Adulto	Maduro	N.R.	119	Captura	SP-C	Agosto/2006
10	BP 146	F	Filhote	Imaturo	N.R.	90	Encalhe	SP-C	Janeiro/2007
11	BP 151	F	NR	N.R.	N.R.	N.R.	Captura	SP-C	Maió/ 2007
12	BP 152	F	Adulto	Maduro	21,6	132	Captura	SP-C	Maió/2007

N	NÚMERO DO TOMBO	SEXO	FAIXA ETÁRIA ¹	MATURIDADE SEXUAL ²	PESO (Kg)	CT (cm)	ORIGEM	LOCAL	DATA
13	BP 153	F	Adulto	Maduro	21,6	129	Captura	SP-C	Maio/2007
14	BP 155	F	Jovem	Imaturo	8,3	97	Captura	SP-C	Maio/2007
15	BP 156	F	Adulto	Maduro	N.R.	117	Captura	SP-S	Julho/2007
16	BP 159	M	Adulto	Maduro	21,6	130	Captura	SP-C	Setembro/2007
17	BP 160	M	Jovem	Imaturo	11,7	105	Captura	SP-C	Setembro/2007
18	BP 161	F	Adulto	Maduro	25,1	138	Captura	SP-C	Setembro/2007
19	IPEC 095	M	Adulto	Maduro	16	113,7	Captura	SP-S	Setembro/1998
20	MOCA 176	M	Adulto	Maduro	26,7	132,1	Captura	RS-S	Junho/ 1998
21	MOCA 178	M	Adulto	Maduro	23,3	123,4	Captura	RS-S	Junho/ 1998
22	MOCA 194	F	Jovem	Maduro	29,5	123,3	Captura	RS-S	Agosto/1998
23	MOCA 199	M	Jovem	Maduro	19,1	115,5	Captura	RS-S	Outubro/1999
24	MOCA 200	M	Jovem	Imaturo	24,4	107,5	Captura	RS-S	Outubro/1999
25	MOCA 202	M	Jovem	Maduro	24,6	120,5	Captura	RS-S	Outubro/1999

N	NÚMERO DO TOMBO	SEXO	FAIXA ETÁRIA ¹	MATURIDADE SEXUAL ²	PESO (Kg)	CT (cm)	ORIGEM	LOCAL	DATA
26	MOCA 203	M	Jovem	Imaturo	14,4	99,3	Captura	RS-S	Outubro/1999
27	MOCA 204	M	Jovem	Maduro	17	113,5	Captura	RS-S	Outubro/1999
28	MOCA 205	M	Jovem	Maduro	21,4	114	Captura	RS-S	Novembro/1999
29	MOCA 208	M	Adulto	Maduro	27,8	132	Captura	RS-S	Novembro/1999
30	MOCA 209	F	Jovem	Imaturo	20	120	Captura	RS-S	Novembro/1999
31	MOCA 212	F	Jovem	Imaturo	16,6	111,1	Captura	RS-S	Dezembro/1999
32	MOCA 213	F	Jovem	Imaturo	11,6	94	Captura	RS-S	Dezembro/1999
33	MOCA 215	M	NR	N.R.	26	125	Captura	RS-S	Dezembro/1999
34	PA 132	F	Adulto	Maduro	19,2	130	Encalhe	SP-S	Junho/1999

¹A faixa etária foi estimada a partir da avaliação da dentição dos animais.

²Indivíduos machos foram considerados maduros sexualmente com comprimento total a partir de 112 cm, e fêmeas a partir de 122 cm. Padronização de acordo com Rosas e Monteiro-Filho (2002).

CT: Comprimento total

RS-S: Litoral sul do Rio Grande do Sul

SP-C: Litoral central de São Paulo

SP-S: Litoral sul de São Paulo

NR: Não reportado

APÊNDICE A – Lista de diagnósticos finais. Organização dos diagnósticos segundo a localização, condição ou alteração. (Richard J. Montali, National Zoological Park, Washington, EUA). Julho de 1993

Na maioria dos casos, o diagnóstico final pode ser dado nesta ordem:

(órgão) (condição) (estado de alteração) (intensidade de alteração)

Fígado, hepatite, aguda, marcante

Usualmente, as alterações localizadas em órgãos específicos ou componentes específicos podem ser colocados diretamente depois da condição:

Rim, nefrite, intersticial, crônica, branda

Alguns órgãos requerem que a localização seja adicionada diretamente depois dele:

Ossos, úmero, fratura, composta

Os órgãos que requerem localização são: vasos sanguíneos, osso, articulação, linfonodo e intestinos (delgado ou grosso).

Quando a localização é desconhecida, então acrescentar o termo “localização não específica” é usado.

Quando a lesão afeta múltiplos sítios do mesmo tecido, por exemplo linfonodo, usar:

Linfonodo, múltiplos sítios

Quando partes dos estômagos de ruminantes são listados, o termo inicial pode ser “Estômago”, seguido do compartimento específico ou da alteração observada:

**Estômago, ruminite, ulcerativa
Estômago, abomaso, corpo estranho**

Tanto o órgão como o diagnóstico devem ser sempre mencionados no singular:

Pulmão, granuloma, múltiplo – e não Pulmões, granulomas.

Modificações podem ser adicionadas quando estiverem relacionadas com quantidade, como acima (múltiplo), ou das localizações (Pele, mordidas, múltiplos sítios).