RICARDO YUJI SADO

**Filogenia do processo inflamatório em animais
ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes
teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG**

São Paulo
2004

RICARDO YUJI SADO

**Filogenia do processo inflamatório em animais
ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes
teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG**

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de Concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima

São Paulo
2004

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1390 FMVZ	<p>Sado, Ricardo Yuji</p> <p>Filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG / Ricardo Yuji Sado. – São Paulo : R. Y. Sado, 2004.</p> <p>111 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.</p> <p>Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.</p> <p>Orientador: Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima.</p> <p>1. Peixes. 2. Granuloma. 3. Inflamação. I. Título.</p>
----------------	--

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: SADO, Ricardo Yuji

Título: Filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG

Data: 03 / 09 / 04

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 a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Banca Examinadora

Prof: Dr. Eliziane R. Nakashima Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: APROVAÇÃO Assinatura: Eliziane R. Nakashima

Prof: Dr. BENJAMIN E. MALUCELLI Instituição: FMVZ/USP

Julgamento: APROVAÇÃO Assinatura: Benjamin E. Malucelli

Prof: Dr. MARIA JOSÉ T. RAUANI DE PAIVA Instituição: INSTITUTO DE PESCA

Julgamento: APROVADO Assinatura: Maria José T. Rauani de Paiva

Aos meus pais KENJI e LUIZA

Aos meus irmãos LUCIANA e HEITOR

Ao meu SOBRINHO(A) que está para chegar

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Eliana Reiko Matushima, por acreditar em mim e orientar no longo caminho percorrido para realização desse projeto.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a este projeto.

Ao Instituto Butantã, pelo fornecimento do BCG.

Ao ACQUA MUNDO – Aquário do Guarujá, pelo fornecimento dos animais e toda logística para sua manutenção durante todo o período experimental.

Aos biólogos Paulo de Tarso e Fernando Alvarenga, pelo companheirismo, amizade e profissionalismo dedicados durante minha permanência no ACQUA MUNDO.

À “galera” do MANEJO e todos os estagiários que ajudaram na manutenção dos animais e na coleta de material.

Aos técnicos do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia – FMVZ/USP, pela realização das lâminas de histopatologia.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Patologia – FMVZ/USP, pelo processamento do material para microscopia eletrônica.

À Dra. Elia e aos técnicos da microscopia eletrônica da FM/USP pela atenção, visualização e fotografia do material coletado.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pela realização dos estudos imuno-histoquímicos.

Aos meus AMIGOS, que sempre me incentivaram e me apoiaram nos momentos mais difíceis, sem deixar a peteca cair, são eles: Cururu, Sardela, Snarf, Garibas, Guiga, Paula, Gump, Kussô, Nicole, Xeila, Marcilião, Tita e Waleska.

À todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão desse trabalho, muito obrigado.

VALEU!!!!!!

RESUMO

SADO, R. Y. **Filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos:** estudo comparativo entre peixes teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG. [Phylogeny of the inflammatory process in ectothermic animals: comparative study between primitive and modern telost fish inoculated with BCG]. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O objetivo do presente estudo foi avaliar aspectos histológicos, imuno-histoquímicos e ultra-estruturais da resposta inflamatória induzida experimentalmente, através da inoculação de BCG por via intramuscular em peixes filogeneticamente primitivos do gênero *Arius sp* e modernos do gênero *Centropomus sp*, com o intuito de estabelecer parâmetros comparativos da resposta inflamatória do ponto de vista filogenético entre peixes modernos e primitivos. Os resultados mostram haver diferenças na resposta inflamatória entre peixes modernos e primitivos; sendo que o primeiro tem capacidade de organização da lesão em granulomas típicos e células epitelióides secretoras de proteína S100 e citoqueratina, e que ao longo do experimento desenvolveu junções desmossômicas entre si; enquanto peixes primitivos não possuem capacidade de organização da lesão, não formando granulomas, apenas células gigantes secretoras de proteína S100. Não houve participação expressiva de células gigantes e pigmentares na resposta inflamatória no gênero *Centropomus sp*, sugerindo ser uma característica relacionada à espécie, contrariando alguns resultados verificados em peixes modernos no que diz respeito à participação de células pigmentares.

Palavras-chave: Peixes. Inflamação. Granuloma.

ABSTRACT

SADO, R. Y. **Phylogeny of the inflammatory process in ectothermic animals:** comparative study between primitive and modern telost fish inoculated with BCG. [Filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos: estudo comparativo entre peixes primitivos teleósteos primitivos e modernos inoculados com BCG]. 2004. 111 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

The aim of this study was the evaluation of the histological, imunohistochemical and ultra structural aspect of the inflammatory response experimentally induced by BCG intramuscular injection in phylogenetically primitive fishes of the genera *Arius sp* and modern of the genera *Centropomus sp*, with the purpose of establishing comparative parameters of the inflammatory response between modern and primitive fishes about phylogenetic aspect. The results show differences in the inflammatory response between modern and primitive fishes. Modern fishes have the ability of organization of the lesion, with development of typical granulomas and epithelioid cells that produce S100 protein, cytokeratin and throughout the experiment they developed desmosomic junctions; instead of primitive fishes that don't show the ability of organization of the lesion without forming an granuloma, just giant cells that produce S100 protein. It didn't have an expressive participation of giant cells and pigment-containing cells in the inflammatory reaction in genera *Centropomus sp*, suggesting that It is a specie-specific characteristic, in opposition to some results found in modern fishes about pigment cells participation in the inflammatory reaction of modern fishes.

Key words: Fishes. Inflammation. Granuloma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fotografia de exemplar do gênero <i>Arius sp</i>	19
Figura 2 -	Fotografia de exemplar do gênero <i>Centropomus sp</i>	20
Figura 3 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , apresentando padrão de normalidade histológica. As setas indicam os núcleos na periferia das fibras musculares (HE X 200).....	45
Figura 4 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 24 horas após inoculação de BCG. Observa-se processo inflamatório difuso, com áreas de necrose (N), edema intersticial (E) e infiltrado inflamatório (I) com células mononucleares envolvendo grumos de BCG (HE X 40).....	46
Figura 5 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 24 horas após inoculação de BCG. Observa-se focos de necrose tecidual (N) com deposição de hemossiderina (H), infiltrado inflamatório mononuclear(I) com células de características macrofágicas envolvendo grumos de BCG (setas). Nesse tempo experimental já podemos observar algumas células gigantes (G) envolvendo grumos de BCG (HE X 400).....	47
Figura 6 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 3 dias após inoculação de BCG. Observa-se reação inflamatória difusa, composta por células mononucleares, edema intersticial (E) e necrose das fibras musculares (N) (HE X 40).....	48
Figura 7 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 3 dias após inoculação de BCG. Podemos observar maior quantidade de células gigantes (setas) envolvendo o inóculo e focos de necrose tecidual (N) (HE X 200).....	49
Figura 8 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 7 dias após inoculação de BCG. Observamos processo difuso com aumento no infiltrado inflamatório mononuclear (I) e pontos isolados de necrose tecidual; e edema intersticial discreto (HE X 40).....	50
Figura 9 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 7 dias após inoculação de BCG. Observamos infiltrado inflamatório (I) difuso sobre o foco lesional, porém há uma certa organização das células gigantes envolvendo grumos do inóculo, além do aumento em seu número no processo inflamatório. As setas indicam células gigantes envolvendo grumos de BCG (HE X 200).....	51
Figura 10 -	Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 7 dias após inoculação de BCG. Observamos célula gigante (G) contendo inúmeros núcleos e amplo citoplasma envolvendo o inóculo (seta). Ao redor, há presença de células com características macrofágicas (M); contendo núcleo com cromatina densa e citoplasma delgado, e outras com cromatina frouxa em seu núcleo e amplo citoplasma acidófilo. (HE X 400).....	52

- Figura 11 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 7 dias após inoculação de BCG. Podemos observar intenso processo inflamatório perivascular composto basicamente por células mononucleares com núcleo contendo cromatina densa e citoplasma delgado. A seta indica essas células mononucleares (HE X 400)..... 53
- Figura 12 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 14 dias após inoculação de BCG. Observamos infiltrado inflamatório mononuclear (I) difuso na lesão. Não há edema e necrose tecidual (HE X 40)..... 54
- Figura 13 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 14 dias após inoculação de BCG. Há presença de inúmeras células gigantes envolvendo grumos de BCG (setas); infiltrado inflamatório mononuclear (I) distribuído pela lesão, além de leve hemorragia (H) (HE x 100)..... 55
- Figura 14 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 21 dias após inoculação de BCG. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear (I) difuso no foco lesional, com inúmeras células gigantes envolvendo grumos de BCG (HE X 40)..... 56
- Figura 15 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 21 dias após inoculação de BCG. Podemos observar células gigantes, além de inúmeras células com características macrofágicas (M) espalhadas pela lesão; há também a presença de fibroblastos (setas) caracterizados por estruturas com núcleo e citoplasma com formato alongado (HE X 400)..... 57
- Figura 16 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. Nota-se um padrão reacional difuso, composto por células mononucleares (HE X 40)..... 58
- Figura 17 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. Apesar da reação ser difusa, observamos certa organização das células gigantes (G) envolvendo diversos grumos de BCG (setas) (HE X 200)..... 59
- Figura 18 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. No detalhe, observa-se célula gigante (G) com diversos núcleos envolvendo grumos de BCG. Ao seu redor, inúmeras células com características macrofágicas (M), os quais compõe o infiltrado inflamatório difuso na lesão (HE X 200)..... 60
- Figura 19 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, apresentando padrões de normalidade histológica. Além dos núcleos localizados na periferia das fibras, podemos observar as estriações das fibras musculares. As setas indicam os núcleos situados na periferia da fibra muscular (HE X 400)..... 61
- Figura 20 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 24 horas após inocular BCG (setas). Observa-se infiltrado inflamatório moderado ao redor dos grumos de BCG. Há necrose (N) do tecido muscular, hemorragia (H) e edema intersticial (E) (HE X 100)..... 62

- Figura 21 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 24 horas após inoculação de BCG. Ao redor do inóculo (I), podemos observar células com características macrofágicas (M), possuindo núcleo com cromatina frouxa e citoplasma acidófilo (HE X 1000)..... 63
- Figura 22 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 3 dias após inoculação de BCG. Podemos observar edema intersticial (E) e infiltrado inflamatório mononuclear (I) no foco lesional (HE X 40)..... 64
- Figura 23 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 3 dias após inocular BCG. Observa-se intenso infiltrado inflamatório perivascular (I) constituído por células de cromatina densa e pouco citoplasma (HE X 200)..... 65
- Figura 24 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 3 dias após inocular BCG. Observa-se célula gigante (G) envolvendo o inóculo; células com características macrofágicas (M) espalhadas pela lesão, além de hemácias (setas) (HE X 400)..... 66
- Figura 25 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 7 dias após inocular BCG. Podemos observar intenso infiltrado inflamatório mononuclear (I), algumas células gigantes (G) envolvendo o inóculo, e vasos sangüíneos (V) com hemácias em sua luz, sugerindo um processo de neovascularização (HE X 400)..... 67
- Figura 26 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 7 dias após inocular BCG. Observa-se a formação de estrutura com aspecto de granuloma (G), no qual observamos várias camadas de células ao redor do inóculo, e na porção externa do granuloma, células com cromatina frouxa e citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides (setas) (HE X 400)..... 68
- Figura 27 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se maior organização do foco lesional em diversos granulomas (setas); pontos de necrose tecidual (N) e infiltrado inflamatório mononuclear (I) (HE X 40)..... 69
- Figura 28 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se diversos granulomas (G) compondo um único granuloma maior. Externamente a ele, células fibrocíticas (setas) com núcleo e citoplasma de formato afilado, além de infiltrado inflamatório mononuclear (I) (HE X 100)..... 70
- Figura 29 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se focos de pigmentação (P) sempre associado às hemácias devido ao processo hemorrágico. Observa-se alguns granulomas (G) possuindo em seu interior células com cromatina frouxa e citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides (HE X 400)..... 71
- Figura 30 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inocular BCG. Nota-se granuloma (G), no qual o inóculo é envolvido por diversas camadas de células sugestivas de células epitelióides. Externamente ao

granuloma e fazendo parte do infiltrado inflamatório (I), células com núcleo possuindo cromatina densa e pouco citoplasma (HE X 400).....	72
Figura 31 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 21 dias após inocular BCG. Observa-se organização da lesão em diversos granulomas os quais isolam o inóculo do organismo. Externamente aos granulomas, observamos infiltrado inflamatório mononuclear (HE X 20).....	73
Figura 32 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 21 dias após inocular BCG. Nota-se presença de pigmentação (setas) ao redor do granuloma, associado à presença de hemácias. No interior do granuloma (G), observamos diversas células sugestivas de células epitelióides. Mais externamente ao granuloma e dispersas pelo foco lesional, temos células com características macrofágicas (M) (HE X 200).....	74
Figura 33 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 21 dias após inocular BCG. Observa-se granuloma possuindo em seu centro o inóculo (I), com várias células possuindo amplo citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides. Na porção mais externa, temos a presença de pigmentação (P) (HE X 400).....	75
Figura 34 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 21 dias após inocular BCG. Observa-se algumas células gigantes (G) envolvendo grumos de BCG, além de hemácias (setas) dispersas pela lesão (HE X 400).....	76
Figura 35 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 33 dias após inocular BCG. Observa-se a organização do foco lesional em diversos granulomas, os quais isolam o inóculo do organismo (HE X 40).....	77
Figura 36 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 33 dias após inocular BCG. Observam-se vários granulomas (G) contendo em seu interior BCG e ao seu redor, células sugestivas de células epitelióides. Circundando o granuloma, temos a presença de células fibroblásticas (setas). Externamente, inúmeras células com características macrofágicas (M), além de hemácias espalhadas pela lesão (HE X 200).....	78
Figura 37 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 200).....	79
Figura 38 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 7 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100).....	80
Figura 39 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam área de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100).....	80
Figura 40 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 33 dias após inoculação de BCG. A seta indica área de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG,	

envolvido por uma célula gigante (G) (ABC X 400).....	81
Figura 41 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40).....	82
Figura 42 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100).....	82
Figura 43 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100).....	83
Figura 44 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 200).....	83
Figura 45 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Arius sp</i> , 33 dias após inoculação de BCG. Observa-se reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 negativa (ABC X 100).....	84
Figura 46 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 24 horas após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 40).....	85
Figura 47 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100).....	86
Figura 48 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 40).....	86
Figura 49 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 24 horas após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40).....	87
Figura 50 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100).....	88
Figura 51 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40).....	88
Figura 52 - Fotomicrografia de tecido muscular de <i>Centropomus sp</i> , 24 horas após inoculação de BCG. A ausência de coloração acastanhada indica reação negativa para reação de imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 40).....	89

- Figura 53 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 100)..... 90
- Figura 54 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3, circunscrevendo o granuloma (G) (ABC X 200)..... 90
- Figura 55 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 200)..... 91
- Figura 56 - Eletromicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação intramuscular de BCG. Observa-se ausência de membrana citoplasmática entre os núcleos existentes na célula gigante (X11200)..... 92
- Figura 57 - Eletromicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 21 dias após inoculação de BCG intramuscular. A seta mostra uma junção desmossômica entre duas células epitelióides presentes no foco lesional (X168000)..... 93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Titulações dos anticorpos primários utilizados.....	42
------------	---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Aspectos da biologia dos gêneros <i>Arius sp.</i> e <i>Centropomus sp.</i>	19
1.2	Filogenia da resposta inflamatória	20
2	OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODO	37
3.1	Animais	37
3.1.1	Manutenção dos animais.....	38
3.1.2	Procedimento experimental.....	38
3.1.3	Colheita de material.....	39
3.2	Histopatologia	39
3.3	Imuno-histoquímica	40
3.4	Microscopia eletrônica	41
4	RESULTADOS	44
4.1	Histopatologia	44
4.1.1	<i>Arius sp.</i>	44
4.1.2	<i>Centropomus sp.</i>	61
4.2	Imuno-histoquímica	79
4.2.1	<i>Arius sp.</i>	79
4.2.2	<i>Centropomus sp.</i>	84
4.3	Ultra-estrutura	91
5	DISCUSSÃO	95
5.1	Histopatologia	95
5.1.1	Cinética da resposta inflamatória em peixes primitivos do gênero <i>Arius sp.</i>	95

5.1.2	Cinética da resposta inflamatória em peixes modernos do gênero <i>Centropomus sp.</i>	96
5.2	Imuno-Histoquímica	99
5.3	Ultra-Estrutura	100
5.4	Considerações finais	101
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

Filogeneticamente os peixes teleósteos podem ser divididos em três grupos distintos: peixes primitivos, intermediários e modernos (GOSLINE, 1971).

Segundo Gosline (1971), os teleósteos primitivos possuem fósseis datando do período Jurássico, e sua maior diversificação ocorreu no Mesozóico. Os indivíduos pertencentes a esse grupo fazem parte das ordens Osteoglossiformes, Clupeiformes, Salmoniformes, Cypriniformes, Anguiliformes e Notacanthiformes.

Os teleósteos intermediários são os indivíduos derivados dos primitivos, mas que não possuem todas as características dos peixes modernos. Estes surgiram no período Cretáceo e pertencem a esse grupo os animais das ordens Myctophiformes, Cetomimiformes, Beloniformes, Percopsiformes, Gadiformes, Cyprinodontiformes, Syngnathiformes, Beryciformes, Lampridiformes e Zeiformes (GOSLINE, 1971). Já os teleósteos modernos, segundo Gosline (1971), representam a grande e última proliferação entre os peixes surgindo nos períodos Devoniano a Recente, fazendo parte desse grupo, as ordens Perciformes, Pleuronectiformes, Scorpaeniformes, Gobiesociformes, Tetraodontiformes, Echeneiformes, Mastacembeliformes, Synbranchiformes, Icosteiformes, Pegasiformes e Lophiiformes.

1.1 Aspectos da biologia dos gêneros *Arius sp.* e *Centropomus sp.*

Peixes do gênero *Arius* (Figura 1), pertencentes à família Ariidae são classificados como peixes teleósteos primitivos, fazendo parte da ordem dos Cypriniformes, subordem Siluroidei (GOSLINE, 1971).

Figura 1 - Fotografia de exemplar do gênero *Arius sp*

São comumente encontrados em baías, canais, estuários e ao longo das praias. São peixes de fundo, raramente ultrapassando 30 metros, habitando fundos de areia ou lodo.

Possuem hábitos noturnos e crepusculares, se alimentando de invertebrados bênticos, detritos orgânicos e peixes. Os barbilhões presentes na região anterior da cabeça têm papel tátil importante na captura de alimento enterrado em águas extremamente turvas. Encontrados em grupos, formam cardumes na procriação. Os ovos são incubados pelo macho, e após eclosão os filhotes saem como mini-réplicas dos adultos (CARVALHO FILHO, 1999).

São conhecidos vulgarmente como bagre, bagre-beiçudo e bagre-branco. Tem distribuição no Atlântico Ocidental, Guianas ao sudeste do Brasil (CARVALHO FILHO, 1999).

Peixes do gênero *Centropomus* (Figura 2), pertencentes à família Centropomidae são classificados como peixes teleósteos modernos, fazendo parte da ordem Perciformes, subordem Percoidei, superfamília Percoidae (GOSLINE, 1971).

Figura 2 - Fotografia de exemplar do gênero *Centropomus sp*

São conhecidos vulgarmente como robalo-peba e robalo-flecha, podendo ser encontrados em regiões costeiras, águas rasas de recifes, ilhas, e especialmente baías, canais, estuários, mangues, lagoas e rios costeiros. São espécies consideradas euri-halinas, ou seja, suportam grandes variações de salinidade. São predadores vorazes, se alimentando de peixes e crustáceos. São comumente encontrados em fundos de areia, cascalho ou lodo, sob lajes de recifes, entre algas, no meio das raízes do mangue, em poços e ao redor de bancos de ostras.

Vivem em ambientes com temperatura superior a 16°C. Aproveitam o movimento das marés para se alimentarem de animais, que são arrastados das raízes dos mangues para águas mais profundas e menos protegidas. No Brasil, seu período de reprodução compreende a primavera e final de outono e atingem a maturidade sexual aos três anos de idade (CARVALHO FILHO, 1999).

1.2 Filogenia da resposta inflamatória

O estudo da Patologia Comparada da Inflamação teve início com Metchnikoff (1968), em que o autor baseando-se na teoria evolutiva de Darwin, executou experimentos de fagocitose com espécimes de diferentes filos, classes e ordem de metazoários, visando um

acompanhamento filogenético e dessa maneira propor que a complexidade do processo inflamatório acompanha a complexidade da evolução natural das espécies animais (METCHNIKOFF, 1968; ZWART, 1963). Desse modo a filogênese da inflamação pode ser vista respeitando uma ordem progressiva, caminhando passo a passo dos níveis inferiores aos superiores na escala animal (MONTALI, 1988; ZWART, 1963).

Metchnikoff (1968), autor da teoria celular da imunidade definiu a inflamação como o mais importante fenômeno na Patologia, propondo que os efeitos primários da resposta imune eram células fagocíticas amebóides circulantes (GROSS et al., 1999).

Partindo de experimentos bastante simples, Heifets (1982) levantou a hipótese de que qualquer animal poderia apresentar o fenômeno da fagocitose; além disso, sugerindo que os leucócitos poderiam destruir microrganismos por digestão, reforçando a idéia de que a inflamação poderia ser uma reação benéfica ao organismo. Da mesma forma, Polônio et al. (2000) descreveram a fagocitose como um componente essencial da resposta imune não-específica dos teleósteos contra agentes infecciosos. Esse processo consiste em reconhecimento e aderência no patógeno, englobamento e digestão pelo fagócito.

Em um trabalho mais recente, Newmann et al. (2001) definiram o processo de fagocitose como um mecanismo primitivo de defesa de todos os organismos multicelulares. Esse processo é uma forma de endocitose no qual partículas (debris celulares, microorganismos, etc) são englobadas por vesículas chamadas de fagossomos. As células do sistema imune dos vertebrados como linfócitos B, macrófagos, fibroblastos e granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e heterófilos) são capazes de realizar fagocitose de partículas estranhas em variados graus.

Metchnikoff (1968) iniciou o estudo da filogenia da inflamação a partir de esponjas e medusas, onde pode observar que células mesodérmicas primitivas são capazes de migrar para o foco da lesão (MONTALI, 1988).

Segundo Gross et al. (1999), nos equinodermos as células responsáveis pela fagocitose de organismos estranhos são os celomócitos, encontrados no fluido celomático e dependendo da espécie, podem ser uma mistura de vários tipos morfológicamente diferentes. Ouriços marinhos do gênero *Strongylocentrotus* possuem quatro tipos de celomócitos: fagócitos (presente em todos os equinodermos), células esferóides vermelhas (células pigmentares), células esferóides incolores e células vibráteis. Os celomócitos podem ser considerados como mediadores da resposta imune devido a sua presença ao redor de lesões e infecções na maioria dos equinodermos, estas se tornam rodeadas por um tecido preto ou vermelho escuro composto por células esferóides vermelhas (GROSS et al., 1999).

Os celomócitos também mediam a resposta celular aos desafios impostos ao organismo através da fagocitose, encapsulação, citotoxicidade e produção de agentes antimicrobianos (SILVA et al., 2001b).

Infiltrados de células esferóides vermelhas são descritos como pontos vermelhos no tecido gonadal de ouriços da espécie *Strongylocentrotus intermedius* envolvendo a metacercária de um parasita (GROSS et al., 1999).

Ao redor de lesões infeccionadas e espinhos em regeneração de *Strongylocentrotus purpuratus*, os infiltrados celulares consistem de fagócitos e células esferóides vermelhas. Em estrelas do mar da espécie *Dermasterias imbricata* mostram um considerável número de células no infiltrado, no qual a densidade das células aumenta durante processo crônico (GROSS et al., 1999).

Em estrelas do mar da espécie *Odontaster validus*, existentes no ambiente antártico, apenas algumas células gigantes foram observadas durante experimento de fagocitose *in vitro* e *in vivo*, no qual foi inoculado *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo em longos períodos experimentais (SILVA et al., 2001b).

O mecanismo envolvido na destruição das células de levedura inclui a fusão do material fagocitado com grânulos citoplasmáticos presentes no interior de amebócitos fagocíticos (GROSS et al., 1999; SILVA et al., 2001b).

Segundo Gross et al. (1999), a injeção de células de ouriço da espécie *Arbacia punctulata* no celoma de estrela do mar *Asteria vulgaris*, resultou no acúmulo de fagócitos da estrela do mar e fagocitose das células do ouriço, obtendo-se um rápido “clearance” das células injetadas no fluido celomático.

Em anelídeos, células celomáticas envolvem patógenos e os encapsulam na cavidade celomática; moluscos reagem a agentes infecciosos com lesões granulomatosas, nas quais já se observa a participação de leucócitos que migram de vasos sangüíneos (MONTALI, 1988).

Em insetos, plasmatócitos presentes na hemolinfa mostraram estar envolvidos na encapsulação de substâncias exógenas (TOJO et al., 2000).

Segundo Tojo et al. (2000), em larvas de *Galleria mellonella*, além dos plasmatócitos presentes na hemolinfa, células granulares também estão envolvidas na atividade fagocítica, utilizando-se tintura da Índia.

Dentre os vertebrados ectotérmicos, isto é, peixes, anfíbios e répteis, o estudo do processo inflamatório já é conhecido; mas extensas lacunas no estudo deste fenômeno podem ser observadas.

Em peixes cartilaginosos, a resposta inflamatória é semelhante aos peixes teleósteos, sendo dividida em três fases: resposta aguda, intermediária e crônica (HEUPEL; BENNETT, 1997; HEUPEL; SIMPFENDORFER; BENNETT, 1998).

Segundo Heupel e Bennett (1997) em seu trabalho sobre marcação de elasmobrânquios, tubarões da espécie *Hemiscyllium ocellatum*, a fase aguda é caracterizada por hemorragia e lesão tecidual. Já na fase intermediária da resposta inflamatória, 24 horas após a marcação, pode-se observar o início da reparação tecidual. Eritrócitos ainda estão

presentes, neutrófilos, algumas células basofílicas e monócitos podem ser vistas ao redor da marca e na margem da lesão. Dois a cinco dias após a marcação, observou-se grande migração de neutrófilos, monócitos e um pequeno número de linfócitos para o local da resposta inflamatória. Eritrócitos e trombócitos estavam presentes em toda a fase aguda e intermediária da resposta inflamatória. Com cerca de 10 dias pós-marcação, a fase crônica começa a se caracterizar, com a marca sendo seqüestrada e encapsulada por tecido fibroso. Amostras coletadas após esse período, mostraram apenas um aumento gradual de tecido conectivo ao redor da marca.

Seguindo a mesma linha de trabalho, Heupel, Simpfendorfer e Bennett (1998) descreveram a resposta inflamatória de marcas de identificação em três espécies de tubarões, *Carcharhinus melanopetrus*, *C. obscurus* e *C. plumbeus*. Neles também foram observadas as três fases: aguda, intermediária e crônica (HEUPEL; BENNETT, 1997; HEUPEL; SIMPFENDORFER; BENNETT, 1998).

A resposta aguda é observada em até 5 dias pós-marcação, com hemorragia; eritrócitos e trombócitos estão presentes em grande quantidade, também há migração de neutrófilos para a lesão. Após 20 dias, ainda podemos observar eritrócitos e trombócitos, mas há uma grande migração de basófilos marginalmente à lesão. Uma pequena quantidade de monócitos pode ser visto. À medida que a resposta inflamatória prossegue, a quantidade de eritrócitos e trombócitos decresce, ao mesmo tempo em que monócitos, linfócitos e fibroblastos aumentam. Estágios tardios da resposta inflamatória mostram um crescimento de tecido fibroso ao redor da marca. Mais adiante podemos observar a formação de uma fina camada de tecido conectivo ao redor da lesão e da marca, além da presença de basófilos nos raios cartilaginosos da nadadeira acometida (HEUPEL; SIMPFENDORFER; BENNETT, 1998).

Em relação aos peixes ósseos, diversos estudos a respeito da reação inflamatória têm sido realizados.

Finn e Nielsen (1971b) descreveram o processo inflamatório em trutas arco-íris (*Salmo gairdneri*, Richardson) frente a alguns patógenos inoculados por via intra-muscular. Na fase aguda, com cerca de 12 horas após inoculação, foi observado necrose do tecido muscular, hemorragia e edema intersticial e marginalização de polimorfonucleares. Após 24 horas, havia pouca hemorragia, e infiltrado celular com maior quantidade de macrófagos. A medida em que os dias passam e a reação vai se cronificando há aumento na quantidade de macrófagos no espaço extravascular, assim como polimorfonucleares. Ao redor do 16º dia, não há sinais de necrose tecidual e as células presentes em maior número são fibrócitos, responsáveis pelo processo de fibroplasia, além da proliferação de células epitelióides.

Trabalhos realizados com bagre-do-canal (*Ictalurus punctatus*), um siluriforme considerado primitivo (GOSLINE, 1971), com implantes hormonais na cavidade peritoneal demonstraram após um período de 22 semanas, a formação de uma cápsula ao redor do implante. Esta era composta de duas camadas. A camada mais interna era composta principalmente por macrófagos, alguns neutrófilos, células gigantes multinucleadas e linfócitos. Contornando essa camada, uma cápsula fibrosa formada de fibras reticulares (colágeno tipo III) e colágeno tipo I, compondo uma matriz de suporte para macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. Na camada mais externa ainda observou-se a presença de tecido adiposo em sua volta (GOODWIN; GRIZZLE, 1991).

Segundo Goodwin e Grizzle (1991), no mesmo trabalho acima citado, implantes utilizando-se lâminas de vidro apresentavam em sua superfície células gigantes com cerca de 1mm de diâmetro, além de várias células gigantes multinucleadas e macrófagos. As células gigantes possuíam formato irregular, com pseudópodes conectando-os com macrófagos e outras células gigantes.

Em *Tanichthys albonubes*, peixe primitivo da família Cyprinidae (GOSLINE, 1971), infectados por *Mycobacterium sp* apresentaram macroscopicamente uma massa branca e

gelatinosa na cavidade abdominal. Ao exame histopatológico, observou-se tecido de granulação envolvendo vários órgãos da cavidade, sendo composto por fibroblastos, elementos vasculares e muitas células fagocíticas multinucleadas, como células do tipo Langhans. No interior desse tecido de granulação haviam nódulos formados por células epitelióides, possuindo ocasionalmente conteúdo necrótico (GÓMEZ, 1998).

Doenças como a micose ulcerativa em *Brevoortia tyrannus*, infecção fúngica em *Bairdiella chrysoura* e micobacteriose em *Oreochromis mossambicus* estimulam a formação de um granuloma, no qual se observam células epitelióides, possuindo entre elas, interdigitações citoplasmáticas e tonofilamentos, assemelhando-se aos desmossomos presentes nas células epiteliais de mamíferos (NOGA; DYKSTRA; WRIGHT, 1989).

Nesse mesmo trabalho de Noga, Dykstra e Wright (1989), apenas as células presentes na lesão da micose ulcerativa apresentaram positividade para citoqueratina em reação imuno-histoquímica.

A observação de células gigantes multinucleadas do tipo Langhans pode mostrar que a resposta inflamatória crônica a tuberculose em teleósteos marinhos tem as mesmas características das observadas em vertebrados superiores nos estágios mais tardios da doença (GÓMEZ, 1998).

Em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*, classificados como teleósteos modernos (GOSLINE, 1971), inoculados experimentalmente com BCG em sua musculatura para estudo da resposta crônica granulomatosa realizado por Matushima (1994), demonstrou a seguinte cinética da resposta inflamatória: nos primeiros dias, foi observado intenso infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e ocasionalmente, células gigantes tipo corpo estranho. No decorrer do tempo experimental, houve aumento do infiltrado composto por células mononucleares, sendo macrófagos e trombócitos.

Após 7 dias, observou-se a presença de algumas células contendo pigmento no interior do citoplasma distribuídas ao longo da lesão, sendo denominados como melanomacrófagos. No 14º dia em diante, pode-se observar acúmulo de tecido fibroso e maior organização das células inflamatórias na lesão. Houve maior acúmulo de células pigmentares. À medida que o processo se cronificava, uma maior organização das células macrofágicas na reação granulomatosa podia ser observada. Essas células possuíam amplo citoplasma e núcleo, sugestivas de células epitelióides, comprovado após reação imuno-histoquímica para citoqueratina. Ao realizar o exame ultra-estrutural dessas células, pode-se observar junções desmossomais entre elas (MATUSHIMA, 1994).

Ao redor do granuloma, margeando as células pigmentares, observou-se trombócitos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos e fibroblastos compondo a reação inflamatória; além de células gigantes do tipo corpo estranho. Através de reação imuno-histoquímica, foram observadas células com características epiteliais envolvendo grumos de BCG (MATUSHIMA, 1994).

Seguindo a mesma linha de pesquisa de Matushima (1994), mas utilizando peixes do gênero *Poecilia*, pertencentes à ordem Ciprinodontoidei, considerados filogeneticamente como peixes teleósteos intermediários (GOSLINE, 1971), estudos da cinética da reação inflamatória foram realizados por Rego (1999).

Em seu estudo, utilizando a mesma metodologia de Matushima (1994), os peixes foram inoculados com BCG por via intra-muscular na região do pedúnculo caudal e após, amostras de tecido muscular foram coletados em diferentes tempos experimentais, sendo feito cortes histológicos para identificação dos tipos celulares. Após 24 horas, observou-se infiltrado inflamatório com células mononucleares, áreas de necrose e edema. Dois dias depois, observou-se um grande número de macrófagos e eosinófilos, além do aparecimento de células pigmentares distribuídas ao redor da lesão. Três dias depois começa a haver a organização ao

redor da lesão com a presença de eosinófilos e mastócitos. Uma semana depois, foi observada a formação de granulomas com células epitelióides ao seu redor e um maior número de células pigmentares. Decorridas duas semanas da inoculação predominam as formações granulomatosas com participação de células epitelióides, macrófagos e células pigmentares. Após 21 dias, há formação de um granuloma típico, com centro necrótico composto pelo inóculo, circundado por camadas de células epitelióides. Células pigmentares também estão presentes, não havendo mais a participação de eosinófilos, mastócitos e linfócitos. Trinta dias depois, temos a presença do granuloma com os mesmos tipos celulares anteriormente descritos e com células pigmentares circundando o granuloma. O processo inflamatório está restrito ao granuloma (REGO, 1999).

O que podemos sugerir, é que exista possivelmente uma evolução na resposta inflamatória desses animais de acordo com sua posição na escala filogenética. Isto é, há início de uma especialização celular a medida em que ascendemos na escala evolutiva, como observado no estudo da filogenia da resposta inflamatória iniciada por Elie Metchnikoff.

Em peixes da espécie *Carassius auratus*, peixe filogeneticamente primitivo (GOSLINE, 1971) infectados por *Ribeiroia marini*, metacercária de parasitas digenéticos, obteve-se uma resposta inflamatória no qual primeiramente consistiu de um infiltrado de granulócitos neutrofílicos e macrófagos. Ao seu redor, houve deposição de tecido fibroso e células epitelióides formando uma matriz e posterior encapsulação. Nas primeiras 48 horas, houve predomínio de neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Margeando o tecido fibroso, células epitelióides com pseudópodes e junções desmossomais entre elas também foram observadas (HUIZINGA; NADAKAVUKAREN, 1997).

Em uma fase mais tardia do processo, após 7 dias, a composição de leucócitos foi basicamente a mesma, com neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos, com predominância dessas.

Outro estudo realizado com peixes da espécie *C. auratus*, mas inoculando-se *Mycobacterium fortuitum* e *M. smegmatis* por via intra-peritoneal, houve o desenvolvimento de uma resposta granulomatosa crônica similar a uma infecção natural por *Mycobacteria* (TALAAT et al., 1999).

Oito semanas após inocular *M. fortuitum*, exames histológicos mostraram moderada peritonite caracterizada pelo acúmulo de macrófagos, linfócitos e tecido fibroso ao redor dos órgãos internos; além de uma reação granulomatosa apresentando em seu interior uma massa necrótica de aspecto caseoso e circundada por linfócitos, macrófagos e células epitelióides. Também foram observados alguns acúmulos de melanomacrófagos e células gigantes. Já os animais inoculados com *M. smegmatis* apresentaram uma resposta inflamatória intensa, além de grande número de células gigantes no peritônio durante a formação tardia do granuloma (HOWARD; BYRD, 2000; TALAAT et al., 1999).

Infecções experimentais com *M. marinum* em peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* também demonstraram a presença de células epitelióides e pigmentação, sendo ela originária de melanomacrófagos (COLORNI et al., 1998).

Essa pigmentação provém de centros de melanomacrófagos existentes normalmente no tecido renal, mas também podem ser encontrados em outros órgãos como o fígado e baço. Esses centros, por sua vez, acredita-se fazerem parte do sistema imune não específico relacionado com diversos processos fisiológicos, entre eles, processamento de material antigênico e não antigênico e catabolismo de células sanguíneas (AGIUS; ROBERTS, 2003; HERRAEZ; ZAPATA, 1986), já que ocorre aumento gradual dos centros de melanomacrófagos no decorrer do processo inflamatório inferindo ação bactericida direta (COLORNI et al., 1998).

Lesões granulomatosas em brânquias, baço e rins de peixes da espécie *Channa striatus*, “snakehead” contaminados por *Mycobacterium sp.* apresentavam necrose caseosa na

região central da lesão, circundadas por camadas de macrófagos e células epitelióides. Alguns desses granulomas apresentavam células que continham melanina em seu citoplasma, mas não foram observadas células gigantes (CHINABUT; LIMSUWAN; CHANRATCHAKOOL, 1990).

Em douradas (*Sparus aurata* L.) foram encontrados granulomas em diversos estágios de desenvolvimento em rim, baço e fígado, caracterizando-se pela proliferação de células epitelióides e histiócitos ocupando a porção central, com reação fibrosa na periferia do granuloma (RAMOS, 2000).

A análise histopatológica das lesões revelou três tipos de granulomas nesses animais. Segundo Ramos (2000), o primeiro pode ter se formado a partir de um centro melanomacrofágico, rodeado por células epitelióides e tecido fibroso formando uma cápsula; o segundo tipo continha uma massa necrótica amorfa, com alguma pigmentação, possuindo uma fina cápsula de células epitelióides e tecido fibroso; e um terceiro tipo, semelhante aos anteriores, mas apresentando um anel externo composto por células pigmentares. Todos os órgãos acometidos, principalmente o rim, apresentavam centros de melanomacrófaos e um grande número de eosinófilos. Em nenhum dos animais foram observadas células gigantes multinucleadas.

Peixes da espécie *Odonthestes bonariensis* contaminados por *Mycobacterium sp*, também apresentavam lesões granulomatosas em rim e baço, além de outros órgãos como fígado e pâncreas. Como descrito anteriormente por diversos autores, no centro do granuloma havia uma massa necrótica de aspecto caseoso com bacilos álcool-ácido resistentes, rodeadas por células epitelióides. Essas células tinham aspecto compacto, devido a grande infiltração de granulócitos, circundados por elementos fibrilares. Nenhuma célula gigante foi observada (HATAI et al., 1993).

Em peixes antárticos *Notothenia coriiceps*, utilizando-se uma lâmina de vidro implantada na cavidade abdominal, pode-se observar no decorrer da resposta inflamatória à lamínula a presença de macrófagos com formas variáveis, alguns neutrófilos no início do processo, tendo seu número aumentado consideravelmente à medida que o processo evoluía. Doze horas depois, já se observava um grande número de células gigantes e alguns linfócitos (SILVA et al., 2002).

Em animais ectotérmicos, sabe-se que muitos de seus processos fisiológicos, entre eles o metabolismo e sistema imunológico, possuem sua velocidade e eficiência influenciada pela temperatura, sendo elas diretamente proporcionais. Já animais que vivem em ambientes extremos possuem adaptações que permitem uma normal manutenção de seus processos fisiológicos, como observado por Silva et al. (2002), no qual a resposta inflamatória não sofre influência das baixas temperaturas em animais adaptados à condições extremas. O contrário ocorre em peixes adaptados a climas temperados e tropicais.

Diversos trabalhos visando o estudo da influência da temperatura no sistema imune de peixes mostraram o mesmo é diretamente dependente da temperatura, apresentando um aumento da atividade fagocitária e diminuição do tempo de migração dessas células ao local da lesão com acréscimo da temperatura; o contrário ocorrendo ao diminuir a temperatura da água (ALCORN; MURRAY; PASCHO, 2002; FINN; NIELSEN, 1971a; PLUMB; WISE; ROGERS, 1986; POLONIO et al., 2000).

Da mesma forma, Huizinga e Nadakavukaren (1997) também observaram a mesma relação entre temperatura e velocidade da resposta inflamatória, no qual o tempo de encapsulação da metacercária de *Ribeiroia Marini* em peixes da espécie *Carassiu auratus*, a uma temperatura de 22°C durou cerca de 7 dias; enquanto que em peixes vulgarmente chamados de linguado, o processo se concluiu em 28 dias à temperatura de 12°C em metacercárias da espécie *Stephanochasmus baccatus*.

Em peixes da espécie *Sebastes sp* capturados da natureza, ao exame macroscópico, foi observado múltiplos nódulos esbranquiçados em rim e baço. Esses granulomas estavam organizados com células epitelióides na periferia, a semelhança de uma infecção por *Mycobacterium sp*, além de vários desses granulomas, conterem bactérias álcool-ácido resistentes (KENT et al., 2001).

Contra agentes microbianos, os peixes respondem com células recrutadas rapidamente da circulação e de estoques no tecido hematopoiético, como macrófagos e neutrófilos, os quais migram rapidamente para o local da inflamação destruindo qualquer patógeno em potencial (NEWMANN et al., 2001).

Trabalhos realizados inoculando-se *E. coli* inativadas em formalina na bexiga natatória de tilápias (*Oreochromis niloticus*) demonstraram a degranulação de células eosinofílicas no ponto da injeção do material estranho, com posterior migração de neutrófilos para o local da inflamação (MATSUYAMA; IIDA, 1999).

Segundo Matsuyama e Iida (1999), essas células eosinofílicas estão diretamente relacionadas com mecanismos de defesa, já que a degranulação dessas células ocorre após a inoculação de certos agentes patogênicos (*Aeromonas salmonicida* e *Vibrio anguillarum*), a celularidade aumenta em infestações por parasitas, além de estarem presentes em vasos sangüíneos de interfaces entre indivíduo e ambiente, tais como pele e intestinos.

Em rãs da espécie *Rana catesbeiana* infectados por *M. marinum*, foram observadas numerosas lesões nodulares e esbranquiçadas nas vísceras desses animais. Ao exame histopatológico, observou-se intensa atividade de células epitelióides, mas nenhuma célula gigante (SILVA et al., 2001a).

Em gambás da espécie *Trichosurus vulpecula*, um marsupial existente na Austrália, infectados com *M. bovis* apresentam a região central da lesão necrótica envolvido por um grande número de neutrófilos limitando o granuloma a poucas ou nenhuma célula gigante.

Nesses animais, é bem raro ocorrer mineralização ou encapsulação por tecido fibroso (BUDDLE; YOUNG, 2000).

Infecção pelo complexo *M. avium* em marsupiais da espécie *Setonix brachyurus* resultou numa lesão necrótica envolta por camadas de macrófagos, células epitelióides, e células circulares contidos entre a cápsula fibrosa do rim. Já uma infecção por *M. intracellulare* em *Bettongia penicillata*, também um marsupial, resultou no desenvolvimento de uma reação poligranulomatosa nas articulações. As áreas afetadas apresentam zonas com macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células plasmáticas em torno da região central e caseosa (BUDDLE; YOUNG, 2000).

Em trabalho realizado por Sripa e Kaewkes (2000), hamsters foram infectados experimentalmente com metacercárias de *Opisthorchis viverrini* retirados de peixes ciprinóides naturalmente infectados. Como resultado, obtiveram uma reação inflamatória na região periportal do fígado com células mononucleares e eosinófilos. A medida em que o processo se cronificava, observou-se fibrose periductal, infiltração de células mononucleares e agregação linfóide, com posterior formação de um granuloma.

Como pudemos observar através da literatura, muitos são os estudos realizados no intuito de se observar a cinética da reação inflamatória, assim como os tipos celulares predominantes no processo, no entanto, a maioria deles é voltado para uma única espécie de peixe ou mamífero, não havendo um estudo comparativo entre diferentes espécies pertencentes à diferentes posições na escala filogenética. Sendo assim, o presente estudo realizará com o intuito de preencher essa lacuna existente, um estudo comparativo da resposta inflamatória entre peixes considerados primitivos, e peixes modernos (GOSLINE, 1971), afim de um maior esclarecimento da filogenia do processo inflamatório em animais ectotérmicos.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente projeto tem como objetivos:

1. Avaliar a cinética da resposta inflamatória induzida experimentalmente através da inoculação de BCG por via intramuscular em peixes do gênero *Centropomus sp* e *Arius sp*.
2. Descrever a ultra-estrutura das células envolvidas no processo inflamatório induzido nesses dois gêneros.
3. Comparar filogeneticamente, o padrão de resposta inflamatória de *Centropomus sp*, gênero considerado evolutivamente moderno, com o padrão da resposta inflamatória de *Arius sp*, gênero considerado evolutivamente primitivo (GOSLINE, 1971).
4. Avaliar morfológicamente, e do ponto de vista imuno-histoquímico, as fases do desenvolvimento do granuloma em *Centropomus sp* e *Arius sp*.
5. Buscar subsídios para ampliar o conhecimento da resposta inflamatória em peixes, contribuindo para um melhor conhecimento da filogenia do processo.

3 MATERIAL E MÉTODO

3 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nas instalações do ACQUA MUNDO – Aquário do Guarujá – SP, no primeiro semestre de 2002.

3.1 Animais

Foram utilizados um total de 102 animais capturados através de linha e anzol no canal de Bertioga-SP, divididos em dois grupos distintos, sendo coletados sequencialmente de acordo com os tempos experimentais de 1, 3, 7, 14, 21 e 33 dias (MATUSHIMA, 1994) de seis animais cada e um grupo controle.

Um grupo era composto por animais de gênero *Centropomus* e outro por peixes do gênero *Arius*, sendo o primeiro pertencente filogeneticamente ao grupo de peixes modernos e o segundo, ao grupo dos primitivos (GOSLINE, 1971).

Os animais do gênero *Centropomus* tinham comprimento médio de 26,83cm. Já os animais pertencentes ao gênero *Arius* tinham em média 22,31cm. A proporção entre machos e fêmeas foi aleatória, sendo que todos os animais eram jovens.

3.1.1 Manutenção dos animais

Os animais foram mantidos em tanques circulares com cerca de 1000 litros de volume, obedecendo ao tempo de adaptação desses animais ao cativeiro, até que se alimentassem espontaneamente. A alimentação era composta de filé de peixe e camarão oferecido a cada dois dias.

A água utilizada era proveniente do mar, sendo antes armazenada em caixas d'água, passando por filtros de sedimento. Era fornecida aeração constante nos tanques e a troca de água era realizada a cada dois dias após alimentação, perfazendo um volume de troca de cerca de três quartos do volume total. A temperatura da água variou de 26 a 29°C e o pH de 8,0 a 8,2.

3.1.2 Procedimento experimental

Primeiramente os animais foram anestesiados, através da imersão em solução de benzocaína, na concentração de 1:10.000, em solução alcoólica (FERREIRA, 1979; WEDEMEYER, 1970).

Após anestesia, foi realizada a antissepsia do local de inoculação com álcool 70%GL e iodo. A inoculação foi realizada na região de pedúnculo caudal, do lado direito e logo acima da linha lateral. Foi utilizado um volume de 0,05ml da vacina BCG (Bacilo Calmette – Guérin) proveniente do Instituto Butantã – SP, na concentração de 40mg/5ml.

Após procedimento de inoculação, os animais eram devolvidos para seus respectivos tanques, no qual retomavam seu comportamento normal após cerca de 5 minutos.

3.1.3. Colheita de material

Ao final de cada tempo experimental (1, 3, 7, 14, 21 e 33 dias), os animais foram sacrificados por imersão em solução supersaturada de benzocaína.

Após o sacrifício, era feita a colheita do material retirando-se com uma lâmina de bisturi, um fragmento com cerca de 3cm² da região inoculada, que era imediatamente fixado em formol a 10%.

3.2 Histopatologia

O material coletado era fixado em formol a 10% por no mínimo 24 horas, sendo posteriormente desidratado em soluções alcoólicas crescentes; diafanizado em xilol; incluído em parafina, cortado em micrótomo para obtenção de cortes de 5 micrômetros de espessura; desparafinado em xilol; hidratado e corado pela técnica da Hematoxilina-Eosina (HE); sendo montados em lâmina e lamínula (LUNA, 1992).

As lâminas montadas foram observadas em microscópio de luz comum nos aumentos de 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes.

A documentação fotográfica foi feita através de fotomicroscópio, através da captura digital da imagem, nos aumentos de 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes.

3.3 Imuno-histoquímica

Após inclusão do material coletado em parafina, foram obtidos cortes de 5 micrômetros de espessura. Estes foram montados em lâminas que continham filme de silano a 4% em acetona.

Posteriormente estas lâminas foram desparafinizadas a quente e a frio em xilol; hidratadas em soluções decrescentes de álcool; pré-tratadas para recuperação de antígenos, através de calor sob pressão em solução de ácido cítrico 0,01M em pH 6,0 (utilizado somente para os anticorpos para BCG e Citoqueratina AE1/AE3); tiveram a peroxidase endógena bloqueada com água oxigenada (peróxido de hidrogênio) a 6% diluída em metanol; incubadas com anticorpo primário (Quadro 1) diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% e PBS em câmara úmida por 18 horas a 4°C; lavadas em tampão PBS; incubados com anticorpo secundário biotinilado, na diluição 1/300, em câmara úmida a 37°C; lavadas em tampão PBS; incubadas com complexo Avidina-Biotina-Peroxidase na mesma diluição em câmara úmida a 37°C; lavadas em tampão PBS; revelação com substrato cromogênio (diaminobenzidina 60mg% + 1,0ml de água oxigenada a 6%); contracoradas levemente em Hematoxilina de Harrys; os cortes foram desidratados através de passagens consecutivas em soluções crescentes de álcool e montados em Entellan.

ANTICORPO	FABRICANTE	DILUIÇÃO
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG)	Dako A/S Denmark	1:100.000
Proteína S100	Dakopatt A/S Denmark	1:15.000
Citoqueratina clone AE1/AE3	Dakopatt A/S Denmark	1:800

Quadro 1 – Titulações dos anticorpos primários utilizados

3.4 Microscopia eletrônica

Os animais foram sacrificados nos tempos experimentais de 14, 21 e 33 dias após inoculação com BCG.

O sacrifício dos animais foi realizado através da imersão dos animais em uma solução supersaturada de benzocaína.

Após o sacrifício, foi realizada a colheita de fragmentos com cerca de 3mm² da região do pedúnculo caudal, no lado direito e logo acima da linha lateral, que eram imediatamente fixados em solução de glutaraldeído a 2% em tampão de Milloning por duas horas à temperatura ambiente e transferidos a seguir para solução de cloreto de sódio a 0,65% e mantidos, posteriormente em acetato de uranila aquoso a 1% até o dia seguinte.

Depois, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona P.A e incluídos em araldite 502. Os blocos obtidos permitiram a confecção de cortes semi-finos de aproximadamente 300nm, corados pela técnica de Azul de Toluidina (LUNA, 1992), a fim de se selecionar as áreas de maior interesse. Obtendo-se posteriormente os cortes ultra-finos na espessura de 50 a 70nm, e montadas em tela de cobre de 200 meches, contrastadas com citrato de chumbo e acetato de uranila a 2%.

As imagens foram fotografadas em microscópio eletrônico de transmissão, utilizando-se filme específico de 8,3 x 10,2cm.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos no experimento foram divididos em tópicos, de acordo com o exame realizado.

4.1 Histopatologia

Os dados de histopatológicos estão divididos por gênero.

4.1.1 *Arius sp.*

Ao exame histopatológico, o grupo controle apresenta musculatura esquelética estriada, apresentando feixes musculares com núcleos periféricos. Podemos observar também a ausência de infiltrado inflamatório entre as fibras musculares ou qualquer sinal de lesão tecidual (Figura 3).

Figura 3 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, apresentando padrão de normalidade histológica. As setas indicam os núcleos na periferia das fibras musculares (HE X 200)

Decorridas 24 horas após inoculação do BCG, verifica-se reação inflamatória difusa, edema caracterizado pela dissociação das fibras musculares e focos de necrose tecidual. Sobre esses focos de necrose, temos presença de pigmentação, provavelmente deposição de hemossiderina devido à hemorragia. Disperso pelo foco lesional, há um infiltrado inflamatório composto por células mononucleares com características macrofágicas, algumas possuindo cromatina densa e citoplasma delgado, e outras com cromatina frouxa, e amplo citoplasma acidófilo. Nesse tempo experimental já há presença de algumas células gigantes envolvendo grumos de BCG (Figuras 4 e 5).

Figura 4 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 24 horas após inoculação de BCG. Observa-se processo inflamatório difuso, com áreas de necrose (N), edema intersticial (E) e infiltrado inflamatório (I) com células mononucleares envolvendo grumos de BCG (HE X 40)

Figura 5 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 24 horas após inoculação de BCG. Observa-se focos de necrose tecidual (N) com deposição de hemossiderina (H), infiltrado inflamatório mononuclear(I) com células de características macrofágicas envolvendo grumos de BCG (setas). Nesse tempo experimental já podemos observar algumas células gigantes (G) envolvendo grumos de BCG (HE X 400)

No terceiro dia pós-inoculação de BCG, ainda observamos o mesmo padrão inflamatório difuso, edema intersticial, focos de necrose tecidual e hemorragia. Após três dias, evidenciamos aumento na quantidade de células gigantes envolvendo grumos de BCG. O infiltrado inflamatório é composto por células mononucleares com características fagocíticas, apresentando células com núcleo contendo cromatina frouxa e citoplasma amplo e outras com cromatina densa e citoplasma delgado (Figuras 6 e 7).

Figura 6 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 3 dias após inoculação de BCG. Observa-se reação inflamatória difusa composta por células mononucleares, edema intersticial (E) e necrose das fibras musculares (N) (HE X 40)

Figura 7 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 3 dias após inoculação de BCG. Podemos observar maior quantidade de células gigantes (setas) envolvendo o inóculo e focos de necrose tecidual (N) (HE X 200)

No sétimo dia após a inoculação de BCG, observamos aumento do infiltrado inflamatório. O padrão reacional ainda é difuso, apesar de haver aumento e certa organização das células gigantes ao redor de grumos de BCG. Nesse tempo experimental ocorre edema intersticial discreto, além de pontos isolados de necrose tecidual. As células gigantes se apresentam com inúmeros núcleos e amplo citoplasma. Podemos observar também reação inflamatória perivascular constituída de células com núcleo apresentando densa cromatina e citoplasma delgado, sendo sugestivas de macrófagos imaturos migrando para o foco lesional (Figuras 8, 9, 10 e 11).

Figura 8 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 7 dias após inoculação de BCG. Observamos processo difuso com aumento no infiltrado inflamatório mononuclear (I), pontos isolados de necrose tecidual e edema intersticial discreto (HE X 40)

Figura 9 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 7 dias após inoculação de BCG. Observamos infiltrado inflamatório (I) difuso sobre o foco lesional, porém há uma certa organização das células gigantes envolvendo grumos do inóculo, além do aumento em seu número no processo inflamatório. As setas indicam células gigantes envolvendo grumos de BCG (HE X 200)

Figura 10 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 7 dias após inoculação de BCG. Observamos célula gigante (G) contendo inúmeros núcleos e amplo citoplasma envolvendo o inoculo (seta). Ao redor, há presença de células com características macrofágicas (M); algumas contendo núcleo com cromatina densa e citoplasma delgado, e outras com cromatina frouxa em seu núcleo e amplo citoplasma acidófilo (HE X 400)

Figura 11 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 7 dias após inoculação de BCG. Podemos observar intenso processo inflamatório perivascular composto basicamente por células mononucleares com núcleo contendo cromatina densa e citoplasma delgado. A seta indica essas células mononucleares (HE X 400)

Decorridos 14 dias da inoculação de BCG, a resposta inflamatória começa a apresentar um padrão constante, no qual verifica-se infiltrado inflamatório mononuclear difuso no foco lesional, células gigantes envolvendo o inóculo e hemorragia discreta. Não há edema intersticial nem necrose tecidual (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 14 dias após inoculação de BCG. Observamos infiltrado inflamatório mononuclear (I) difuso na lesão. Não há edema e necrose tecidual (HE X 40)

Figura 13 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 14 dias após inoculação de BCG. Há presença de inúmeras células gigantes envolvendo grumos de BCG (setas); infiltrado inflamatório mononuclear (I) distribuído pela lesão, além de leve hemorragia(H) (HE x 100)

Decorridos 21 dias da inoculação do BCG, não há mudança no padrão reacional em relação ao tempo anterior. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear e difuso na lesão, além da presença de células gigantes. Apesar da lesão não apresentar uma organização na forma de um granuloma, ela tende a diminuir de tamanho. Há apresentação de células fibrocíticas marginalmente à lesão (Figuras 14 e 15).

Figura 14 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear (I) difuso no foco lesional, com inúmeras células gigantes envolvendo grumos de BCG (HE X 40)

Figura 15 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. Podemos observar células gigantes, além de inúmeras células com características macrofágicas (M) espalhadas pela lesão; há também a presença de fibroblastos (setas) caracterizados por estruturas com núcleo e citoplasma com formato alongado (HE X 400)

Após 33 dias, o padrão da resposta inflamatória é semelhante ao tempo experimental anterior (21 dias), ou seja, infiltrado inflamatório mononuclear difuso pela lesão e inúmeras células gigantes (Figuras 16, 17 e 18).

Figura 16 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 33 dias após inoculação de BCG. Nota-se um padrão reacional difuso, composto por células mononucleares (HE X 40)

Figura 17 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 33 dias após inoculação de BCG. Apesar da reação ser difusa, observamos certa organização das células gigantes (G) envolvendo diversos grumos de BCG (setas) (HE X 200)

Figura 18 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. No detalhe, observa-se célula gigante (G) com diversos núcleos envolvendo grumos de BCG. Ao seu redor, inúmeras células com características macrofágicas (M), os quais compõe o infiltrado inflamatório difuso na lesão (HE X 200)

4.1.2 *Centropomus sp.*

Ao exame histopatológico, o grupo controle apresenta musculatura esquelética estriada normal com feixes musculares apresentando núcleos periféricos. Podemos observar as estriações das fibras musculares e ausência de lesão tecidual ou infiltrado inflamatório (Figura 19).

Figura 19 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, apresentando padrões de normalidade histológica. Além dos núcleos localizados na periferia das fibras, podemos observar as estriações das fibras musculares. As setas indicam os núcleos situados na periferia da fibra muscular (HE X 400)

Após 24 horas da inoculação do BCG, há um processo inflamatório difuso com infiltrado moderado composto por células mononucleares, sendo mais evidente ao redor dos grupos de BCG. Essas células possuem características macrofágicas, com núcleo apresentando cromatina frouxa e citoplasma acidófilo. Podemos observar edema intersticial,

hemorragia e necrose das fibras musculares, caracterizando um processo agudo (Figuras 20 e 21).

Figura 20 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 24 horas após inocular BCG (setas). Observa-se infiltrado inflamatório moderado ao redor dos grupos de BCG. Há necrose (N) do tecido muscular, hemorragia (H) e edema intersticial (E) (HE X 100)

Figura 21 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 24 horas após inoculação de BCG. Ao redor do inóculo (I), podemos observar células com características macrofágicas (M), possuindo núcleo com cromatina frouxa e citoplasma acidófilo (HE X 1000)

Após 3 dias da inoculação do BCG, ainda ocorre edema intersticial e hemorragia. Apesar do padrão reacional ser difuso, já há uma tendência a organização das células em torno do inóculo. Verifica-se aumento do infiltrado inflamatório composto basicamente por células mononucleares, com características macrofágicas. Ao redor do BCG, essas células possuem núcleo com cromatina frouxa e amplo citoplasma; enquanto as células presentes no foco lesional e na reação inflamatória perivascular apresentam cromatina densa com pouco citoplasma, provavelmente representando células macrofágicas imaturas em processo de migração para a lesão. Nesse tempo experimental já podemos observar algumas células gigantes englobando grumos de BCG e início de apresentação fibrocítica (Figuras 22, 23 e 24).

Figura 22 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 3 dias após inoculação de BCG. Podemos observar edema intersticial (E) e infiltrado inflamatório mononuclear (I) no foco lesional (HE X 40)

Figura 23 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 3 dias após inocular BCG. Observa-se intenso infiltrado inflamatório perivascular (I) constituído por células de cromatina densa e pouco citoplasma (HE X 200)

Figura 24 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 3 dias após inocular BCG. Observa-se célula gigante (G) envolvendo o inóculo; células com características macrofágicas (M) espalhadas pela lesão, além de hemácias (setas) (HE X 400)

Decorridos 7 dias da inoculação de BCG, ainda persiste um discreto edema intersticial com alguns pontos de necrose tecidual e hemorragia, além de um intenso infiltrado inflamatório mononuclear e aumento das células fibroblásticas. O foco lesional começa a apresentar progressiva organização observada pelo aumento das camadas de células ao redor do inóculo, sugerindo a tendência a formar um granuloma. Essas células que envolvem o inóculo possuem cromatina frouxa, e amplo citoplasma acidófilo com inúmeros vacúolos, sendo sugestivas de células epitelióides. Nesse tempo experimental, ainda temos a presença de células gigantes. Externamente aos granulomas, há diversas células de características macrofágicas, possuindo cromatina densa e pouco citoplasma (Figuras 25 e 26).

Figura 25 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 7 dias após inocular BCG. Podemos observar intenso infiltrado inflamatório mononuclear (I), algumas células gigantes (G) envolvendo o inóculo, e vasos sangüíneos (V) com hemácias em sua luz, sugerindo um processo de neovascularização (HE X 400)

Figura 26 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 7 dias após inocular BCG. Observa-se a formação de estrutura com aspecto de granuloma (G), no qual observamos várias camadas de células ao redor do inóculo, e na porção externa do granuloma, células com cromatina frouxa e citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides (setas) (HE X 400)

Decorridos 14 dias após inoculação do BCG, não é mais visualizado edema intersticial, mas ainda permanecem pontos de necrose tecidual. O foco lesional se apresenta cada vez mais organizado, podendo ser observado várias formações granulomatosas; sendo que vários dessas formações se fundem formando um ainda maior. Há intenso infiltrado inflamatório mononuclear, aumento de células fibroblásticas na porção externa ao granuloma. Nesse tempo experimental há certa pigmentação, sendo esta relacionada com hemácias devido processo hemorrágico. Ainda podem ser encontradas células gigantes. Envolvendo o inóculo, podemos observar células com cromatina frouxa, e amplo citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides. Externamente aos granulomas, espalhadas pela lesão, células com características macrofágicas possuindo cromatina densa e pouco citoplasma (Figuras 27, 28, 29 e 30).

Figura 27 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se maior organização do foco lesional em diversos granulomas (setas); pontos de necrose tecidual (N) e infiltrado inflamatório mononuclear (I) (HE X 40)

Figura 28 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se diversos granulomas (G) compondo um único granuloma maior. Externamente a ele, células fibrocíticas (setas) com núcleo e citoplasma de formato afilado, além de infiltrado inflamatório mononuclear (I) (HE X 100)

Figura 29 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 14 dias após inocular BCG. Observa-se focos de pigmentação (P) sempre associado às hemácias devido ao processo hemorrágico. Observa-se alguns granulomas (G) possuindo em seu interior células com cromatina frouxa e citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides (HE X 400)

Figura 30 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 14 dias após inocular BCG. Nota-se granuloma (G), no qual o inóculo é envolvido por diversas camadas de células, sugestivas de células epitelióides. Externamente ao granuloma e fazendo parte do infiltrado inflamatório (I), células com núcleo possuindo cromatina densa e pouco citoplasma (HE X 400)

Depois de 21 dias, não há edema intersticial, com apenas alguns pontos de necrose tecidual. Há presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear e maior deposição de fibroblastos na porção externa ao granuloma. A presença de pigmentação está sempre associada à presença de hemácias; há presença de células gigantes envolvendo grumos de BCG. Como no tempo experimental anterior, há células compondo o granuloma, as quais possuem núcleo com cromatina frouxa, e amplo citoplasma vacuolizado, sendo sugestivas de células epitelióides. Externamente aos granulomas, células com características macrofágicas possuindo cromatina densa e pouco citoplasma (Figuras 31, 32, 33 e 34).

Figura 31 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inocular BCG. Observa-se organização da lesão em diversos granulomas os quais isolam o inóculo do organismo. Externamente aos granulomas, observamos infiltrado inflamatório mononuclear (HE X 20)

Figura 32 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inocular BCG. Nota-se presença de pigmentação (setas) ao redor do granuloma, associado à presença de hemácias. No interior do granuloma (G), observamos diversas células sugestivas de células epitelióides. Mais externamente ao granuloma e dispersas pelo foco lesional, temos células com características macrofágicas (M) (HE X 200)

Figura 33 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inocular BCG. Observa-se granuloma possuindo em seu centro o inóculo (I), com várias células possuindo amplo citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides. Na porção mais externa, temos a presença de pigmentação (P) (HE X 400).

Figura 34 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inocular BCG. Observa-se algumas células gigantes (G) envolvendo grumos de BCG, além de hemácias (setas) dispersas pela lesão (HE X 400)

No tempo experimental mais longo, 33 dias, não houve mudança do padrão reacional em relação ao tempo experimental anterior. Há possivelmente uma diminuição do foco lesional, presença de infiltrado inflamatório mononuclear e com pontos isolados de necrose tecidual. Há hemorragia discreta e as mesmas células com características macrofágicas compondo a reação granulomatosa, além de células fibrocíticas na porção externa ao granuloma. Como observado anteriormente, a lesão está organizada na forma de vários granulomas. (Figuras 35 e 36).

Figura 35 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 33 dias após inocular BCG. Observa-se a organização do foco lesional em diversos granulomas, os quais isolam o inóculo do organismo (HE X 40)

Figura 36 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 33 dias após inocular BCG. Observam-se vários granulomas (G) contendo em seu interior BCG e ao seu redor, células sugestivas de células epitelióides. Circundando o granuloma, temos a presença de células fibroblásticas (setas). Externamente, inúmeras células com características macrofágicas (M), além de hemácias dispersas pela lesão (HE X 200)

4.2 Imuno-histoquímica

Os resultados da imuno-histoquímica foram divididos de acordo com os gêneros estudados.

4.2.1 *Arius sp.*

A pesquisa de BCG pela técnica de imuno-histoquímica, acusou positividade em todos os tempos experimentais. Essa positividade pode ser observada através da coloração acastanhada. Até três dias após inoculação, a marcação do BCG é difusa (Figura 37), tornando-se mais definida nos tempos subseqüentes.(Figuras 38, 39 e 40).

Figura 37 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 200)

Figura 38 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 7 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100)

Figura 39 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam área de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100)

Figura 40 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. A seta indica área de positividade para imuno-histoquímica anti-BCG, envolvido por uma célula gigante (G) (ABC X 400)

A pesquisa da presença macrófagos através de imuno-histoquímica anti-proteína S100 também se mostrou positiva para todos os tempos experimentais. Essa positividade pode ser verificada pela coloração acastanhada (Figuras 41, 42, 43 e 44).

Figura 41 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40)

Figura 42 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100)

Figura 43 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100)

Figura 44 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 200)

A reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3, marcador policlonal para citoqueratina, mostrou-se nesse gênero negativo em todos os tempos experimentais (Figura 45).

Figura 45 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Arius sp*, 33 dias após inoculação de BCG. Observa-se reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 negativa (ABC X 100)

4.2.2 *Centropomus sp.*

Semelhante ao resultado obtido para peixes do gênero *Arius*, a pesquisa de BCG através da imuno-histoquímica apresentou positividade em todos os tempos experimentais. A positividade observada através da coloração acastanhada foi difusa nos primeiros tempos experimentais (Figura 46), tornando-se mais evidente e delimitada nos tempos subsequentes. (Figuras 47 e 48).

Figura 46 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 24 horas após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 40)

Figura 47 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 3 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 100)

Figura 48 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-BCG (ABC X 40)

A pesquisa de macrófagos pela reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 mostrou-se positiva em todos os tempos experimentais, o qual observamos a coloração acastanhada. Essa positividade se torna mais intensa e delimitada no decorrer do processo, mostrando progressiva organização em granulomas (Figuras 49, 50 e 51).

Figura 49 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 24 horas após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40)

Figura 50 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 100)

Figura 51 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-proteína S100 (ABC X 40)

A pesquisa para citoqueratina através da reação de imuno-histoquímica anti-AE1AE3, mostrou-se negativa até 7 dias após inoculação de BCG. Essa negatividade pode ser observada através da ausência de coloração acastanhada nos cortes histológicos (Figura 52).

Figura 52 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 24 horas após inoculação de BCG. A ausência de coloração acastanhada indica reação negativa para reação de imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 40)

A partir de 14 dias após inoculação de BCG, podemos verificar positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3. Esse resultado sugere a presença de células epitelióides nos estágios finais da formação do granuloma nesse gênero de peixe, de acordo com as suposições feitas através do exame histopatológico realizado anteriormente (Figuras 53, 54 e 55).

Figura 53 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 14 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 100)

Figura 54 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp.*, 21 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3, circunscrevendo o granuloma (G) (ABC X 200)

Figura 55 - Fotomicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 33 dias após inoculação de BCG. As setas indicam áreas de positividade para reação imuno-histoquímica anti-AE1AE3 (ABC X 200)

4.3 Ultra-estrutura

Como demonstrado no exame histopatológico, a resposta inflamatória de peixes do gênero *Arius sp* é composta basicamente por células gigantes multinucleadas. O exame ultra-estrutural dessas células gigantes mostra não haver divisão entre os núcleos por uma membrana citoplasmática, sendo todos pertencentes a uma única célula (Figura 56).

Nos peixes do gênero *Centropomus sp*, a partir do sétimo dia após inoculação do BCG já podemos observar ao exame histopatológico, células com aspecto espumoso, possuindo amplo citoplasma vacuolizado, sendo sugestivas de células epitelióides. Ao exame ultra-estrutural, essas células apresentam características de células epiteliais, apresentando junções desmossomais entre si, além de expressarem positividade a citoqueratina na reação imuno-histoquímica (Figura 57).

Figura 56 - Eletromicrografia de tecido muscular de *Arius sp.*, 33 dias após inoculação intramuscular de BCG. Observa-se ausência de membrana citoplasmática entre os núcleos existentes na célula gigante (X11200)

Figura 57 - Eletromicrografia de tecido muscular de *Centropomus sp*, 21 dias após inoculação de BCG intramuscular. A seta mostra uma junção desmossômica entre duas células epitelióides presentes no foco lesional (X168000)

5 DISCUSSÃO

A discussão dos resultados obtidos foi dividido em itens de acordo com o exame realizado.

5.1 Histopatologia

A discussão dos dados histopatológicos foi dividida de acordo com os gêneros estudados.

5.1.1 Cinética da resposta inflamatória em peixes primitivos do gênero *Arius sp.*

Decorridas 24 horas após inoculação do BCG, observa-se uma reação inflamatória difusa, edema caracterizado pela dissociação das fibras musculares e focos de necrose tecidual. Um infiltrado inflamatório composto predominantemente por células mononucleares macrofágicas esteve difundido pelo foco lesional, sendo que essa fase inicial também foi verificada por Finn e Nielsen (1971b).

No presente estudo ocorreu uma intensa reação perivascular, indicativo da migração de células macrofágicas para o foco lesional, o que condiz com experimentos realizados por Finn e Nielson (1971b); Matushima (1994) e Nash, Fletcher e Thomson (1986).

No decorrer do experimento, há uma diminuição no edema intersticial, aumento do infiltrado inflamatório mononuclear, além do aumento no número de células gigantes multinucleadas. Esse quadro se estende até os 33 dias após inoculação do BCG. A formação de células gigantes também foi descrita por Abernethy e Lund (1978); Gómez (1998); Goodwin e Grizzle (1991); Howard e Byrd (2000); Pulsford e Matthews (1991); Talaat et al. (1999) e Xavier e Matushima (1993). No presente estudo, em momento algum ocorreu formação de um granuloma com a presença de células epitelióides. Nos peixes do gênero *Arius sp*, esse achado contraria diversos autores, os quais verificaram a formação de células epitelióides no decorrer do processo inflamatório em peixes considerados primitivos (FINN; NIELSEN, 1971b; GÓMEZ, 1998; HOWARD; BYRD, 2000; HUIZINGA; NADAKAVUKAREN, 1997; TALAAT et al., 1999).

5.1.2 Cinética da resposta inflamatória em peixes modernos do gênero *Centropomus sp*.

Após 24 horas da inoculação do BCG, ocorre um processo inflamatório difuso com infiltrado discreto composto por células mononucleares, sendo melhor visualizado ao redor dos grumos de BCG. Essas células possuem características macrofágicas, com núcleo possuindo cromatina frouxa e citoplasma acidófilo. Há edema intersticial, hemorragia e necrose das fibras musculares, caracterizando um processo agudo. Esse quadro inicial da resposta inflamatória possui as mesmas características da resposta inicial tanto de peixes considerados primitivos, intermediários ou modernos por Gosline (1971), o que pôde ser verificado comparando-se trabalhos realizados por Finn e Nielsen (1971b); Matushima (1994); Rego (1999) e Timur, Roberts e McQueen (1997).

Após 3 dias da inoculação do BCG, ainda ocorre edema intersticial e hemorragia. Apesar do padrão reacional ser difuso, já há uma tendência a organização das células em torno do inóculo. Observa-se aumento do infiltrado inflamatório composto basicamente por células mononucleares, com características macrofágicas. Ao redor do BCG, essas células possuem núcleo com cromatina frouxa e amplo citoplasma; enquanto que as células presentes no foco lesional e na reação inflamatória perivascular apresentam cromatina densa com pouco citoplasma, provavelmente representando células macrofágicas imaturas em processo de migração para a lesão. Nesse tempo experimental já há presença de algumas células gigantes englobando grumos de BCG e início de apresentação fibrocítica.

A presença de células gigantes na resposta inflamatória de peixes considerados filogeneticamente modernos (GOSLINE, 1971) pode ser um fenômeno ligado não só a posição filogenética do animal, mas também a uma característica ligada à espécie, já que peixes também considerados modernos apresentam esses tipos celulares (MATUSHIMA, 1994; TIMUR; ROBERTS; MCQUEEN, 1977), ao passo que outras não apresentam (GOMÉZ et al., 1993; RAMOS, 2000).

No decorrer do processo inflamatório, ocorre gradativamente diminuição do edema intersticial e necrose tecidual, com aumento do infiltrado inflamatório mononuclear e células fibroblásticas. Há também progressiva organização do foco lesional em um granuloma, apresentando a partir do sétimo dia, células com cromatina frouxa e citoplasma acidófilo envolvendo o inóculo, sugestivas de células epitelióides. Exteriormente ao granuloma, inúmeras células com características macrofágicas, possuindo cromatina densa, e pouco citoplasma.

Do 14º dia em diante, não há mais edema intersticial, mas ainda permanecem pontos de necrose tecidual. O foco lesional se apresenta cada vez mais organizado, ocorrendo várias formações granulomatosas; sendo que vários desses granulomas se fundem formando um

ainda maior. Há um intenso infiltrado inflamatório mononuclear e aumento de células fibroblásticas na porção externa ao granuloma. Nesse tempo experimental há presença de certa pigmentação, sendo esta relacionada com a lise de hemácias devido processo hemorrágico. Ainda podem ser encontradas células gigantes. Compreendendo o granuloma, há aumento no número de células com cromatina frouxa, e amplo citoplasma vacuolizado, sugestivas de células epitelióides. Característica também encontrada em algumas espécies primitivas e demais espécies modernas (CHINABUT, 1999; CHINABUT; LIMSUWAN; CHANRATCHAKOOL, 1990; FINN; NIELSEN, 1971b; GÓMEZ, 1998; GOMÉZ et al., 1993; HATAI et al., 1993; HEDRICK; MCDOWELL; GROFF, 1987; HOWARD; BYRD, 2000; HUIZINGA et al., 1990; KENT et al., 2001; MATUSHIMA, 1994; NADAKAVUKAREN, 1997; NOGA; DYKSTRA; WRIGHT, 1989; RAMOS, 2000; REGO, 1999; TALAAT et al., 1999; TIMUR; ROBERTS; MCQUEEN, 1977).

A participação de células pigmentares na resposta inflamatória não foi expressiva, já que a pigmentação encontrada apenas no 14^o e 21^o dia pós-inoculação está relacionado com o processo hemorrágico local. O fato verificado contraria diversos autores, os quais observaram uma participação expressiva de células pigmentares no processo inflamatório de peixes modernos (CHINABUT, 1999; CHINABUT; LIMSUWAN; CHANRATCHAKOOL, 1990; GIAVENNI et al., 1980; MATUSHIMA, 1994; NOGA, 1996; NOGA; WRIGHT; PASARELL, 1990; RAMOS, 2000) e intermediários (REGO, 1999).

5.2 Imuno-histoquímica

Através da reação imuno-histoquímica anti-BCG, verificamos um padrão reacional semelhante nos dois gêneros, no qual o inóculo, inicialmente se apresenta difuso na lesão, posteriormente sendo restritos ao centro do granuloma em peixes do gênero *Centropomus sp*, e no interior das células gigantes em peixes do gênero *Arius sp*. Esse padrão reacional se assemelha aos verificados por Carabias et al. (1998); Matushima (1994); Radhakrishman et al. (1991) e Rego (1999).

A presença de células fagocíticas positivas à proteína S100 no presente estudo se mostrou logo no primeiro tempo experimental e aumentando no decorrer do experimento em ambos os gêneros. A presença de proteína S100 também foi verificada nas células epitelióides em granulomas de mamíferos (FALK; TAKESHITA; STUTTE, 1988; MOMOTANI et al., 1993; MULLER; TAKESHITA, 1991; SINGH, 1994).

Semelhante ao presente estudo, Rego (1999) verificou positividade à proteína S100 logo no primeiro dia pós-inoculação em peixes do gênero *Poecilia sp*, considerado filogeneticamente intermediário (GOSLINE, 1971), tornando-se mais evidente no decorrer dos tempos experimentais, sugerindo o desenvolvimento do granuloma. Apesar dos animais do gênero *Arius sp* não apresentarem a formação de um granuloma típico, o comportamento das células positivas à proteína S100 se assemelham ao encontrado por Rego (1999), o qual também podemos sugerir, o desenvolvimento da reação inflamatória característica desse gênero, composta basicamente por células gigantes, e sem a formação de um granuloma típico.

Ao realizarmos reação imuno-histoquímica com anticorpos anti-citoqueratina AE1/AE3, verificamos características singulares em cada um dos gêneros estudados. Nos

peixes considerados primitivos (GOSLINE, 1971), do gênero *Arius sp* em nenhum dos tempos experimentais houve positividade para citoqueratina, enquanto que nos animais do gênero *Centropomus sp*, considerados como modernos (GOSLINE, 1971) a partir do 14º dia do experimento observamos positividade para citoqueratina, tempo este que através da análise histopatológica já podemos observar células com características epitelióides, o qual vai se intensificando até o 33º dia.

O resultado verificado em muito se assemelha ao encontrado por Matushima (1994); Noga, Dykstra e Wright (1989), os quais também observaram positividade a citoqueratina em peixes considerados filogeneticamente modernos.

5.3 Ultra-estrutura

Como demonstrado nos resultados, nos animais do gênero *Arius sp*, as células gigantes multinucleadas ao exame ultra-estrutural não apresentavam membrana citoplasmática entre os diversos núcleos, sendo essa característica também descrita por Mariano (1973) em seu estudo sobre a origem e função dessas células.

Nos peixes do gênero *Centropomus sp*, ao exame ultra-estrutural, as células epitelióides que compunham o granuloma apresentaram entre si junções desmossomais, os quais determinam características de células epiteliais, além de apresentarem reação cruzada com a citoqueratina humana. As mesmas características ultra-estruturais também foram observadas por Rego (1999) em peixes intermediários, Matushima (1994) e Noga, Dykstra e Wright (1989) em peixes modernos.

Porém, apenas Matushima (1994) e Noga, Dykstra e Wright (1989) observaram positividade à reação com citoqueratina humana, sendo que o último, apenas para micose ulcerativa. A não positividade a citoqueratina humana nesses animais, apesar de apresentarem desmossomos entre as células epitelióides pode estar relacionada à posição filogenética do animal (REGO, 1999) ou ao agente envolvido (MATUSHIMA, 1994; NOGA; DYKSTRA; WRIGHT, 1989). O peixe utilizado por Rego (1999) pertence ao gênero *Poecilia* considerado filogeneticamente intermediário (GOSLINE, 1971) talvez não apresente especialização celular que os leve a apresentar as características secretórias de uma célula epitelial, como ocorre com os peixes filogeneticamente modernos.

Os animais utilizados no estudo de Noga, Dykstra e Wright (1989) são considerados modernos, mas apenas um deles apresentou positividade a citoqueratina, apesar de todos terem apresentado desmossomos e tonofilamentos bem desenvolvidos entre as células, contrariando os achados do presente trabalho. Alguns fatores podem ter levado a esse resultado, como um possível falso negativo, muito comum quando se utiliza reagente monoclonal e tecidos fixados (NOGA; DYKSTRA; WRIGHT, 1989).

5.4 Considerações finais

Com base nos resultados obtidos e a literatura consultada, podemos inferir que há diferenças específicas na resposta inflamatória frente a um determinado estímulo nos peixes pertencentes a diferentes posições filogenéticas, ou seja, primitivos, intermediários ou modernos, proposto por Gosline (1971).

Nas espécies primitivas verificamos uma resposta difusa composta basicamente por células gigantes, sem formação de um granuloma e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides (GÓMEZ, 1998; GOODWIN; GRIZZLE, 1991; HOWARD; BYRD, 2000; TALAAT et al., 1999; XAVIER; MATUSHIMA, 1993), conseqüentemente negativas a expressão de citoqueratina.

Nos peixes considerados intermediários, já se verifica uma resposta mais organizada, em forma de um granuloma circundado por células epitelióides, mas estas células não sofrem diferenciação a ponto de apresentarem características epiteliais, apresentando negatividade à reação imunohistoquímica anti-citoqueratina AE1/AE3 (REGO, 1999).

Finalmente em peixes considerados modernos, observamos uma resposta organizada na forma de um granuloma com células epitelióides, sendo que essas células sofrem diferenciação e adquirem características de uma célula epitelial, apresentando junções desmossômicas entre as células adjacentes, positividade para citoqueratina e atividade secretória (MATUSHIMA, 1994; NOGA; DYKSTRA; WRIGHT, 1989), sugerindo que possam isolar de uma maneira mais eficiente o patógeno do hospedeiro.

O fato de algumas espécies de peixes considerados primitivos apresentarem a formação de células epitelióides (FINN; NIELSEN, 1971b; GÓMEZ, 1998; HOWARD; BYRD, 2000; HUIZINGA; NADAKAVUKAREN, 1997; TALAAT et al., 1999), podemos inferir que essas espécies estejam em uma posição na escala filogenética próxima aos animais pertencentes ao grupo dos intermediários, começando assim, a apresentar algumas características desse grupo, mas não apresentando tamanha especialização celular a ponto de expressarem características morfológicas e funcionais de uma célula epitelial, como a presença de desmossomos entre células adjacentes e positividade à reação imunohistoquímica para citoqueratina AE1/AE3, mas apenas características macrofágicas.

Da mesma forma, a não participação de células pigmentares no processo inflamatório de peixes do gênero *Centropomus*, considerado filogeneticamente moderno, pode estar relacionada à sua posição na escala evolutiva, já que esse gênero é considerado o mais antigo dentro do grupo dos Perciformes, peixes considerados modernos. Estes apresentam a capacidade de isolar o agente irritante de forma eficiente através da formação de um granuloma com células epitelióides, mas não apresentam células pigmentares durante o processo inflamatório. Uma outra hipótese seria o fato de existirem milhares de gêneros e espécies de peixes nos mais diferentes habitats; como consequência poderiam existir padrões reacionais distintos com relação à participação das células pigmentares frente a determinado agente, o que justificaria algumas diferenças na resposta inflamatória em diferentes gêneros, mas pertencentes à mesma posição filogenética.

Para tais afirmações, futuros estudos no que diz respeito à cinética da resposta inflamatória comparando-se animais de diferentes grupos filogenéticos ou mesmo pertencentes ao mesmo grupo, mas de espécies diferentes, serão necessários para um maior entendimento da filogenia da resposta inflamatória nos animais ectotérmicos.

6 CONCLUSÃO

1. Após inoculação de BCG por via intramuscular em peixes do gênero *Arius sp*, considerados filogeneticamente primitivos (GOSLINE, 1971), verifica-se durante todo tempo experimental uma resposta inflamatória difusa composta basicamente por células mononucleares, o qual não sofre nenhuma organização em um granuloma, apenas aumento no número de células gigantes. Em todos os tempos experimentais, pudemos observar positividade à reação imuno-histoquímica para BCG e proteína S100; o contrário ocorrendo em relação à expressão de citoqueratina AE1AE3, sendo negativa durante todos os tempos experimentais. A ultra-estrutura das células gigantes revelou inúmeros núcleos sem membrana citoplasmática entre si.

2. Após inoculação de BCG por via intramuscular em peixes do gênero *Centropomus sp*, considerados filogeneticamente modernos (GOSLINE, 1971), verifica-se inicialmente uma resposta inflamatória difusa composta basicamente por células mononucleares, organizando-se na forma de granulomas, compostos por camadas de células epiteliais após o sétimo dia pós-inoculação, até sua estabilização com cerca de 21 dias. A participação de células pigmentares no processo inflamatório de *Centropomus sp* não é efetiva, sendo que a pigmentação verificada apenas no 21^o pós-inoculação está relacionada ao depósito de hemossiderina proveniente de hemácias presentes na lesão. Em todos os tempos experimentais, pudemos observar positividade à reação imuno-histoquímica para BCG e proteína S100, sendo que para expressão de citoqueratina AE1AE3 essa positividade só foi observada após 14^o dia pós-inoculação. A ultra-estrutura das células epitelióides revelou a presença de junções desmossomais entre as células adjacentes.

REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, C. S.; LUND, J. E. Mycobacteriosis in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) from the Yakima River. **Journal of Wildlife Disease**, v. 14, n. 3, p. 333-336, 1978.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.
- ALCORN, S. W.; MURRAY, A. L.; PASCHO, R. J. Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 12, n. 4, p. 303-334, 2002.
- BUDDLE, B. M.; YOUNG, L. J. Immunobiology of mycobacterial infections in marsupials. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 5, p. 517-529, 2000.
- CARABIAS, E.; PALENQUE, E.; SERRANO, R.; AGUADO, J. M.; BALLESTIN, C. Evaluation of na immunohistochemical test with polyclonal antibodies raised against mycobacteria used in formalin-fixed tissue compared with mycobacterial specific culture. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 3, p. 385-388, Mar, 1998.
- CARVALHO FILHO, A. **Peixes**: Costa Brasileira. Brasil: Ed. Marca d' Água, 1999. 320 p.
- CHINABUT, S. Mycobacteriosis and Nocardiosis. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders : viral, bacterial, antifungal infections**. 3. ed. Ontario: CABI Publishing, 1999. p. 319-340.
- CHINABUT, S.; LIMSUWAN, C.; CHANRATCHAKOOL, P. Mycobacteriosis in the sanakhead, *Channa striatus* (Fowler). **Journal of Fish Diseases**, v. 13, n. 6, p. 531-535, 1990.

COLORNI, A.; AVTALION, R.; KNIBB, W.; BERGER, E.; COLORNI, B.; TIMAN, B. Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract. **Aquaculture**, v. 160, n. 1-2, p. 1-17, 1998.

FALK, S.; TAKESHITA, M.; STUTTE, H. J. Epithelioid granulomatosis with initial and predominant manifestation in spleen. Morphological and immunohistochemical analysis of six cases. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 414, n. 1, p. 69-76, 1988.

FERREIRA, J. T.; SMITH, G. L.; SCHOONDE, H. J.; HOLZAPFEL, C. W. Comparison of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater fish species. **The Progressive Fish Culturist**, v. 41, n. 3, p. 161-163, 1979.

FINN, J. P.; NIELSEN, N. O. The effect of temperature variations on the inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Pathology**, v. 105, n. 4, p. 257-268, 1971a.

FINN, J. P.; NIELSEN, N. O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 3, p. 463 - 478, 1971b.

GIAVENNI, R.; FINAZZI, M.; POLI, G.; GRIMALDI, E. Tuberculosis in marine tropical fishes in an aquarium. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161-168, 1980.

GOMÉZ, S. Unusual morphopathological features in a case of fish tuberculosis. **Journal of Fish Diseases**, v. 21, n. 3, p. 237-239, 1998.

GOMÉZ, S.; BERNABÉ, A.; GOMÉZ, M. A.; NAVARRO, J. A.; SÁNCHEZ, J. Fish mycobacteriosis: morphopathological and immunocytochemical aspects. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 2, p. 137-141, 1993.

GOODWIN, A. E.; GRIZZLE, J. M. Granulomatous inflammation and monstrous giant cells in response to intraperitoneal hormone implants in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 104, n. 2, p. 149-160, 1991.

GOSLINE, W. A. **Functional morphology and classification of teleostean fishes**. Honolulu: The University Press of Hawaii, 1971, 208 p.

GROSS, P. S.; AL-SHARIF, W. Z.; CLOW, L. A.; SMITH, L. C. Echinoderm immunity and evolution of the complement system. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 429-442, 1999.

HATAI, K.; LAWHAVINIT, O.; TODA, K.; SUGOU, Y. *Mycobacterium* infection in pejerrey, *Odonthestes bonariensis* Cuvier & Valenciennes. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 4, p. 397-402, 1993.

HEDRICK, R. P.; MCDOWELL, P.; GROFF, J. Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 3, p. 391-395, 1987.

HEIFETS, L. Centennial of Metchnikoff's discovery. **Journal of Reticuloendothelial Society**, v. 31, n.5, p. 381-391, 1982.

HERRAEZ, M. P.; ZAPATA, A. G. Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1-4, p. 117-126, 1986.

HEUPEL, M. R.; BENNETT, M. B. Histology of dart tag insertion sites in the epaulette shark. **Journal of Fish Biology**, v. 50, n. 5, p. 1034-1041, 1997.

HEUPEL, M. R.; SIMPFENDORFER, C. A.; BENNETT, M. B. Analysis of tissue responses to fin tagging in Australian carcharhinids. **Journal of Fish Biology**, v. 52, n. 3, p. 610-620, 1998.

HOWARD, S. T.; BYRD, T. F. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 15, p. 1845-1853, 2000.

HUIZINGA, H. W.; NADAKAVUKAREN, M. J. Cellular response of goldfish, *Carassius auratus* (L.), to metacercariae of *Ribeiroia marini* (Faust & Hoffman, 1934). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 6, p. 401-408, 1997.

KENT, M. L.; WATRAL, V.; DAWE, S. C.; RENO, P.; HEIDEL, J. R.; JONES, S. R. M. *Ichthyophonus* and *Mycobacterium*-like bacterial infections in commercially-important rockfish, *Sebastes spp.*, in the eastern North Pacific Ocean. **Journal of Fish Disease**, v. 24, n. 7, p. 427-431, 2001.

LUNA, L. G. **Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Maryland: Jhonson Printers, 1992. p. 88-312.

MARIANO, M. **Sobre a origem e algumas propriedades das células gigantes inflamatórias.** 1973. 37 f. Tese (Livre-Docência em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1973.

MATSUYAMA, T.; IIDA, T. Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. 6, p. 451-457, 1999.

MATUSHIMA, E. R. **Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* – Tilápia do Nilo.** 1994. 120 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

METCHNIKOFF, E. **Lectures on the comparative pathology of inflammation.** New York, Dover Publication, 223 p. 1968.

MOMOTANI, E.; KUBO, M.; ISHIKAWA, Y.; MATSUBARA, Y.; NAKAJIMA, Y.; YIOSHINO, T. Immunohistochemical distribution of S100 alpha-positive cells in bovine mycobacterial and non-mycobacterial granulomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, n. 3, p. 291-301, 1993.

MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. 1, p.1-26, 1988.

MULLER, H.; TAKESHITA, M. In situ immunophenotype of macrophages and lymphocytes in granuloma formation of tuberculous lymphadenitis in HIV- infected and immunocompetent patients. **Research in Virology**, v. 142, n. 2-3, p. 159-172, 1991.

NASH, K. A.; FLETCHER, T. C.; THOMSON, A. W. Migration of fish leucocytes in vitro: the effect of factors which may be involved in mediating inflammation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1-4, p. 83-92, 1986.

NEWMANN, N. F.; STAFFORD, J. L.; BARREDA, D.; AINSWORTH, A. J.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 25, n. 8-9, p. 807-825, 2001.

NOGA, E. J. **Fish disease.** Iowa: Iowa State University Press: Mosby, 1996. 367 p.

NOGA, E. J.; WRIGHT, J. F.; PASARELL, L. Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Comparative Pathology**, v. 102, n. 3, p. 335 - 344, 1990.

NOGA, E. J.; DYKSTRA, M. J.; WRIGHT, J. F. Chronic inflammatory cells with epithelial cell characteristics in teleost fishes. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 5, p. 429-437, 1989.

PLUMB, J. A.; WISE, M. L.; ROGERS, W. A. Modulatory effects of temperature on antibody response and specific resistance to challenge of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, immunized against *Edwardsiella ictaluri*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1-4, p. 297-304, 1986.

POLONIO, R. E.; WOLKE, R. E.; MACLEAN, S. A.; SPERRY, J. F. An *in vitro* assay to measure phagocytosis in striped bass hybrids (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 10, n. 5, p. 405-418, 2000.

PULSFORD, A.; MATTHEWS, R. A. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkii* (Nilsson). **Journal of Fish Diseases**, v. 14, n. 1, p. 67-78, 1991.

RADHAKRISHMAN, V. V.; MATHAI, A.; RADHAKRISHMAN, N. S.; ROUT, D.; SEHGAL, S. Immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens in intracranial tuberculoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 7, p. 641-644, Jul. 1991.

RAMOS, P. Granulomatose visceral em dourada (*Sparus aurata* L.) de presumível etiologia micobacteriana. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 95, n. 536, p. 185-191, 2000.

REGO, A. A. M. S. **Avaliação histológica, imunohistoquímica, ultraestrutural e filogenética da resposta inflamatória induzida experimentalmente pelo BCG em peixes do gênero *Poecilia* (Molinésia)**. 1999. 105 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1999.

SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophage (M:.) of *Notothenia coriiceps*. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. 2, p. 466-478, 2002.

SILVA, I. C.; CARVALHO, E. C. Q.; TORTELLY, R.; COSTA, C. H. C. Granuloma tuberculóide por *Mycobacterium marinum* em rãs (*Rana catesbeiana*). In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, 10., 2001a, Jaboticabal. **Anais...** Jaboticabal: [s. n.], 2001a. p. 16.

SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Comparative study of *in vivo* and *in vitro* phagocytosis including germicidal capacity in *Odontaster validus* (Koehler, 1906) at 0°C. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 77, n. 13, p. 180-185, 2001b.

SRIPA, B.; KAEWKES, S. Localization of parasite antigens and inflammatory responses in experimental opisthorchiasis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 6, p. 735-740, 2000.

TALAAT, A. M.; TRUCKSIS, M.; KANE, A. S.; REIMSCHUESSEL, R. Pathogenicity of *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 151-164, 1999.

TIMUR, M.; ROBERTS, R. J.; MCQUEEN, A. Carrageenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*); a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, n. 1, p. 89-96, 1997.

TOJO, S.; NAGAMURA, F.; ARAKAWA, K.; YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1129-1135, 2000.

WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canadá**, v. 27, n. 5, p. 909-914, 1970.

WHIPPS, C. M.; WATRAL, V. G.; KENT, M. L. Characterization of a *Mycobacterium* sp. in rockfish, *Sebastes alutus* (Gilbert) and *Sebastes reedi* (Westrheim & Tsuyuki), using rDNA sequences. **Journal of Fish Diseases**, v. 26, n. 4, p. 241-245, 2003.

ZWART, P. **Studies on renal pathology in reptiles**. 1963. 118 p. Ter verkrijging van de graad van doctor in de Diergenceskunde aan de Ryksuniversiteit te Utrecht.

XAVIER, J. G.; MATUSHIMA, E. R. Estudo comparado do processo inflamatório em teleósteos: inflamação crônica induzida por BCG em *Corydora nattereri*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7., 1993, Caxambu. **Anais...** Caxambu: [s. n.], 1993. p. 22.