FERNANDO CORLETO MAIORINO

Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG

FERNANDO CORLETO MAIORINO

Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG

Tese 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 Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini

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.1405 FMVZ Maiorino, Fernando Corleto

Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG / Fernando Corleto Maiorino. - São Paulo : F. C. Maiorino, 2004.

99 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, 2004.

Programa de Pós-graduação: Patologia Experimental e Comparada. Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini.

1. Óxido nítrico. 2. Granuloma. 3. Inflamação. 4. Filogenia. 5. Imunohistoquímica. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

PARECER

Interessado: Fernando Corleto Maiorino

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 507/2004, intitulado: "Estudo comparado da participação do óxido nítrico no processo inflamatório", no qual foram utilizados 10 peixes, 10 tartarugas, 10 girinos e 10 hamsters, sob responsabilidade do Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 03 de agosto de 2004

Profa Dra Júlia Maria N

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: MAIORINO, Fernando Corleto

Título: Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG

Tese 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 Doutor em Ciências

Data://		
	Banca Examinadora	
Prof. Dr.	Instituição:	
	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:	Julgamento:	
Prof. Dr.	Instituição:	
Assinatura:		
Prof. Dr.	Instituição:	
A ccinatura:	Inframento:	

"Há na natureza uma força imperecível que transforma os seres de modo ininterrupto com a finalidade de os preservar. Trata-se da razão ou o verbo da natureza.

No homem há também uma força que é análoga àquela da natureza – é a razão ou o verbo do homem. E o verbo do homem é a expressão de sua vontade que a razão dirige.

Sempre que for razoável, esse verbo será onipotente porque será análogo ao próprio verbo de Deus.

O homem se torna o conquistador da vida e pode se tornar o vencedor da morte mediante o verbo da sua razão.

Toda a vida do homem nada mais é do que o parto ou o aborto do seu verbo. Os seres humanos que perecem sem a compreensão da palavra da razão e sem tê-la formulado, perecem sem esperança eterna.

Para a disputa em vantagem contra o fantasma da morte faz-se imprescindível que o homem se identifique com as realidades da vida.

Que importância tem para Deus um aborto perecedor se a vida é eterna? Que importância tem para a natureza uma loucura perecedora se a razão imortal guarda as chaves da vida? A força terrível e justiceira que eternamente assassina os abortos recebeu o nome de Samuel dos hebreus, Satã dos orientais e Lúcifer dos latinos.

O Lúcifer da cabala não é um anjo maldito e fulminado, mas sim o anjo iluminador e regenerador que o faz queimando; é para os anjos da paz aquilo que o cometa é para as plácidas estrelas das constelações da primavera.

A estrela fixa é formosa, resplandecente e serena; respira os aromas do céu e contempla suas irmãs amorosamente; trajada de sua vestimenta esplendorosa e com sua fronte adornada de diamantes, sorri, entoando os cantos matutino e vespertino; ela desfruta um eterno descanso imperturbável e caminha com solenidade sem se deslocar do seu lugar, determinado entre as atalaias da luz.

Em contrapartida, o cometa errante, ensangüentado e desgrenhado, emerge dos abismos do céu; lança-se pelas esferas calmas como uma biga que atravessasse as fileiras de uma procissão de vestais; atreve-se a desafiar a espada flamejante dos guardiões do sol e, tal como uma esposa enamorada que busca o esposo sonhado de suas noites de viuvez, invade até o tabernáculo do monarca dos dias, depois se evadindo e exalando os fogos que o devoram, e arrastando sob seus pés um incêndio prolongado. À sua aproximação, as estrelas se tornam lívidas; os rebanhos das constelações que nas extensas campinas celestes pastam flores de luz parecem debandar sob a ameaça de seu alento terrível. A grande assembléia dos astros tem lugar e a desolação se universaliza. A estrela fixa mais formosa recebe a incumbência de, em nome da totalidade do céu, dirigir-se a esse vagabundo mensageiro e propor-lhe a paz. Meu irmão - começa ela - porque abalas a harmonia de nossas esferas? Qual foi o mal que te causamos e por que, em lugar de vagar sem rumo, não te imobilizas no sítio que te cabe na corte do sol? Por que não te associas a nós na entoação do hino vespertino, envergando como nós um traje alvo que se fixa ao peito por meio de um broche diamantino? Por que em meio aos vapores noturnos deixas flutuar tua cabeleira que derrama um suor ígneo? Oh, quão mais formoso te mostrarias se assumisse um lugar entre a prole celeste! Tua fronte não se inflamaria mais devido à fadiga de teu inaudito percurso velocíssimo; teus olhos ganhariam pureza e teu rosto sorridente se tornaria alvo e rosado como o de tuas venturosas irmãs; todos os astros, sem exceção, te conheceriam e deixando de se intimidar quando tu te aproximas, se encheriam de júbilo ao ver-te próximo, isto porque estaria irmanado a nós mediante os vínculos indestrutíveis da harmonia universal – tua existência se converteria numa voz a mais que se somaria ao cântico do amor infinito.

E esta seria a resposta do cometa à estrela fixa:

Minha irmã, não deves crer que eu tenha o poder de vagar sem rumo e conturbar a harmonia das esferas. Como traçou o teu caminho, Deus também traçou a minha rota e se minha carreira parece a ti equivocada e sem destino, isto acontece porque teus raios não podem atingir tais distâncias que te permitam abarcar o contorno da elipse que me estabeleceram por carreira. Quanto à minha cabeleira de flamas, ela é o fanal de Deus; sou o mensageiro dos sóis e me locupleto no seio de seus fogos para que possa distribuí-los no meu caminho entre os novos mundos que inda carecem de calor e os astros idosos que padecem de frio em sua solidão. Se me canso por causa de minhas longas jornadas, se tua beleza a minha supera, se meus adornos são menos virginais, não penses que por isso deixo de ser, tal como tu, um digno filho do céu. Se não é capaz de compreender-me, deixa-me o segredo de minha sorte terrível, deixa-me à mercê do espanto que me cerca, amaldiçoa-me até...não será por isso que deixarei de cumprir a obra que a mim foi imposta e prosseguirei minha trajetória sob o impulso do sopro de Deus! Sim... venturosas são as estrelas que na sociedade serena dos universos descansam e resplandecem como jovens soberanas! Quanto a mim, sou o proscrito e viajante perene que nenhuma pátria tem senão o infinito. Sou acusado de ser o incendiador dos planetas aos quais ofereço calor e o aterrorizador dos astros aos quais trago luz; reprovam-me porque pelo fato de não cumprir uma rotação em torno dos centros particulares dos universos eu perturbo sua harmonia e os prendo entre si, mantendo meu olhar fixo no centro único de todos nós. Tranqüiliza-te, pois, formosa estrela, porque não desejo despojarte de tua luz serena...pelo contrário, por ti darei minha vida e meu calor. Poderei sumir no céu quando tiver me consumido. E meu destino terá sido tão belo! Saibas que fogos distintos que dão glória a Deus ardem no seu templo. Tu és o lume dos candelabros de ouro e eu sou a flama do sacrifício: cumpramos os nossos destinos."

> Eliphas Levi. 'Dogma e Ritual de Alta Magia.'

Esta Tese é dedicada aos animais, meu maior motivo para viver, e em especial àqueles que se sacrificaram involuntariamente para a realização deste trabalho.

Este trabalho teve apoio de amigos, inclusive financeiro.

"Disseram-vos que a vida é escuridão; e no vosso cansaço, repetis o que os cansados vos disseram.

E eu vos digo que a vida é realmente escuridão, exceto quando há um impulso.

E todo impulso é cego, exceto quando há saber.

E todo saber é vão, exceto quando há trabalho.

E todo trabalho é vazio, exceto quando há amor.

E quando trabalhais com amor, vós vos unis a vós próprios e uns aos outros e uns aos outros, e a Deus.

E que é trabalhar com amor?

É tecer o tecido com fios desfiados de vosso próprio coração, como se vosso bemamado tivesse que usar esse tecido.

É construir uma casa com afeição, como se vosso bem-amado tivesse que habitar essa casa.

É semear as sementes com ternura e recolher a colheita com alegria, como se vosso bem-amado fosse comer-lhe os frutos.

É pôr em todas as coisas que fazeis um sopro de vossa alma,

E saber que todos os abençoados mortos vos rodeiam e vos observam."

Gibran Khalil Gibran 'O Profeta'

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os Orixás, principalmente a meu pai Oxóssi e minha mãe Oxum... .as formas da natureza que nutrem minha alma e me energizam para suportar a vida terrena.

A todos os meus mestres e mestras espirituais, em especial aos quatro pilares da minha vida – Toco, Zé, Seu Cobra-Verde e Pai Bento – sem vocês eu não sou nada... Axé!

Ao Prof. Dr. Idércio Luiz Sinhorini, a quem não denomino apenas orientador, mas um "pai científico", pela sábia orientação, pelas palavras confortadoras e incentivadoras nos momentos críticos e pela amizade desenvolvida em nossos anos de convivência, desde a graduação. Agradeço a Oxalá por tê-lo colocado em meu caminho.

À minha "mãe" Prof ^a Dr ^a Maria Christina Christóvão Ramos... Se eu tivesse que agradecer por tudo, não caberia nessa página; obrigado pela participação em todas as fases desse projeto, por me ensinar a desenvolver raciocínio científico... entre muitas outras coisas. Obrigado por ter me suportado, principalmente nesse final de Tese....Obrigado por voltar a fazer parte da minha vida.

Ao meu pai Dirceu Clementi Maiorino e meu avô João Maiorino, meus exemplos de inteligência, estejam onde estiverem, sei que compartilham comigo essa felicidade.

À minha amada mãe e amiga Estela Corleto Maiorino pelo esforço dispendido durante a vida para que eu pudesse sempre ter bons estudos, por sempre saber o que falar só de olhar nos meus olhos e por sempre ter apostado em mim...Farei de tudo, sempre, para que se orgulhe de mim. Te amo!!!

Ao meu irmão Márcio Corleto Maiorino, por ter tentado sempre ser meu pai...sei que posso contar com você para qualquer coisa. À minha cunhada Alessandra Cervera e meu sobrinho Felipe Cervera Montilha pelo incentivo durante o doutorado.

Ao Prof. Dr. Paulo Maiorka, meu grande amigo e idealizador desse projeto, pelos conselhos fundamentais. Quando eu crescer, quero ser igual a você!

À Prof ^a Dr ^a Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes, mais um anjo que foi colocado no meu caminho. Se não fosse por sua ajuda, não teria havido imunoistoquímica.

Às minhas queridas Luciene Martins Amaral Caruso, minha eterna "gorda", e Simone de Oliveira Castro, minha filha, aluna, etc. por terem sido meus dois braços durante a execução do experimento.

À minha querida também filha, aluna, etc... Fefa Nardino, por ter cedido as tilápias usadas neste trabalho.

À Fundação Parque Zoológico de São Paulo, através do biólogo Prof. Dr. Flávio Molina e do Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, pela doação das tartarugas e instruções de transporte e alimentação.

Ao amigo André, do Ranário Beija Flor, em Bragança Paulista, por ter doado os girinos utilizados neste trabalho e por sua boa vontade sempre em contribuir para o desenvolvimento científico.

À Prof ^a Dr ^a Cláudia Madalena Cabrera Mori, pelo pronto atendimento e por disponibilizar os hamster para este experimento no Biotério do VPT – FMVZ – USP.

Ao Instituto Butantã, através da Diretora da Divisão de Desenvolvimento, Tecnologia e Produção, Drª Hisako Gonodo Higashi pela doação do onco-BCG e do meio de Sauton.

Ao biólogo Cláudio Arroyo pela realização perfeita dos preparados histológicos, por conseguir sempre dar um "jeitinho" para que as lâminas ficassem prontas logo, assim como ao técnico especializado Luciano Antas Bugalho que participou ativamente em todo esse processo.

À amiga Silvia Bracale, sercretária da pós-graduação, por sempre me socorrer com a burocracia, prazos, formulários, datas de reuniões, etc... e pelo incentivo sempre.

Aos técnicos do Laboratório de Farmacologia, Magali Caetano de Souza, Ricardo Batista de Souza, o Jibóia, e Priscila Sales Correia pela ajuda fundamental durante a realização das técnicas imunoistoquímicas.

Ao amigo e companheiro, Prof. Dr. João Batista da Cruz, pela leitura crítica do trabalho e pelas longas conversas nas quais sempre aprendi muita coisa e que deixam saudades.

Ao amigo Prof. Wagner Alexey Back Fiorio, pelos conselhos técnicos e pelo auxílio na interpretação microscópica dos cortes histológicos.

À grande amiga Paula Tavolaro pela ajuda com as fotos e pela confecção do abstract.

Aos meus companheiros veterinários do Lab&Vet, Rosana, Luciana, Diego e Douglas, às secretárias Manu, Carol e Soraia, ao Cléber e Leandro e aos motoqueiros Marcelo, Sílvio, Juninho e Fernando, pela torcida.

Aos meus filhos Mirna, Chris, Gilberto, Denis, Ricardo, Jair, Simone, Estela, Clodoaldo, Carla, Malu, André, Daniel, Júnior e Ivani, pelo apoio espiritual e pelas boas energias sempre enviadas...Que Oxalá os abençoe!

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, meus agradecimentos e meu Axé!

RESUMO

MAIORINO, F.C. Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG. [Compared qualitative evaluation of nitric oxide participacion in chronical granulomatous inflammatory process induced by BCG inoculation]. 2004. 99f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que participa de uma série de processos biológicos fisiológicos sendo produzido por enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Diversos estudos vem demonstrando sua participação na resposta inflamatória crônica, na qual as células inflamatórias, com destaque para os macrófagos, são estimuladas a sintetizarem NOS, que por esse motivo são denominadas induzíveis (iNOS) e passam a produzir o óxido nítrico que vai atuar na modulação do processo. A fim de comprovar sua participação filogenética na resposta granulomatosa, utilizou-se como modelo experimental a inoculação de onco-BCG na musculatura de tilápias-do-Nilo (Oreochromys niloticus) e de girinos de rã touro-gigante (Rana catesbeiana), na região plantar de tartarugas "red ear" (Trachemys scripta elegans) e no coxim plantar de hamsters sírios (Mesocricetus auratus). Fragmentos da lesão foram colhidos aos 14, 28 e 42 dias pósinoculação, fixados em Carnoy por quatro horas, sendo em seguida transferidos para álcool 70° GL. Procedeu-se a confecção de preparados histopatológicos segundo métodos de rotina que foram corados pelo método da hematoxilina e eosina. Imunoistoquímica foi realizada para a verificação da produção de óxido nítrico indiretamente através da marcação da iNOS com anticorpos anti-iNOS humana biotinilados produzidos em coelhos. Observou-se em todos os animais desenvolvimento de granulomas que mostraram tendência a maior organização aos 42 dias; as características celulares foram semelhantes, com algumas variações específicas. Constatou-se marcação imunoistoquímica em macrófagos presentes nas lesões produzidas pela inoculação de BCG em todos os grupos experimentais, exceto nos girinos aos 14 dias, cuja marcação foi irrelevante. Os resultados permitiram concluir que

o óxido nítrico participa da resposta inflamatória granulomatosa, bem como a utilização de

imunoistoquímica mostrou-se método eficiente para evidenciar sua produção em estudos

filogenéticos. Pesquisas futuras deverão qualificar e quantificar mediadores químicos

envolvidos na regulação da participação do óxido nítrico para melhor compreender sua

fisiopatologia na modulação do granuloma inflamatório.

Palavras-chave: Óxido nítrico. Granuloma. Inflamação. Filogenia. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

MAIORINO, F.C. Comparative qualitative evaluation of the role of nitric oxide in chronic granulomatous inflammatory process induced by BCG inoculation. [Avaliação comparada qualitativa da participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação de BCG]. 2004. 99f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Nitric oxide (NO) is a gaseous free radical that takes part in a series of biological physiological processes. It is produced by enzymes called nitric oxide synthetases (NOS). Several studies have demonstrated its role in chronic inflammatory response, in which inflammatory cells, mainly macrophages, are stimulated to synthesize NOS, being called then inducible nitric oxide synthetases (iNOS). Nitric oxide is then produced and acts in the modulation of the process. In order to corroborate its phylogenetic role in granulomatous response, the inoculation of onco-BCG experimental model was used in the muscle of Nile tilapias (Oreochromys niloticus) and bullfrog tadpoles (Rana catesbeiana), in the plantar region of red eared sliders (Trachemys scripta elegans) and in the plantar pad of hamsters (Mesocricetus auratus). Fragments of the lesions were collected at 14, 28 and 42 days after inoculation, fixed in Carnoy for four hours, and then transferred to alcohol 70° GL. After that, histopathological slides were prepared following routine methods, and stained by hematoxylin-eosin. Immunohistochemical tests were performed in order to assess the production of nitric oxide indirectly by means of marking iNOS with biotinylated human anti-iNOS antibodies produced by rabbits. It was observed in all animals that the development of granulomas showed greater tendency of organization at 42 days; cell characteristics were similar, with some specific variations. Immunohistochemical marking was observed in macrophages present in lesions produced by BCG inoculation in all experimental groups, except in tadpoles at 14 days, which showed irrelevant marking. Results enabled the conclusion that nitric oxide takes part in granulomatous inflammatory response. Besides, the use of immunohistochemistry showed to be an efficient method for evidencing the production of nitric oxide in phylogenetic studies. Future research studies should qualify and quantify chemical mediators involved in the regulation nitric oxide role in order to better understand its physiopathology in the modulation of inflammatory granuloma.

Key words: Nitric oxide. Granuloma. Inflammatory process. Phylogenesis. Immunohistochemistry.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Distribuição dos grupos experimentais
Quadro 2 – Relação entre a metodologia empregada e o fenômeno estudado61
LISTA DE TABELAS
Tabela 1 – Mortalidade nos grupos experimentais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese do óxido nítrico	29
Figura 2 – Estrutura molecular da nNOS	30
Figura 3 – Estrutura molecular da iNOS	30
Figura 4 - Secção da musculatura de peixe	56

LISTA DE FOTOGRAFIAS

Foto 1 -	- Manutenção de girinos e peixes no laboratório	49
Foto 2 -	Manutenção de girinos em aquários.	50
Foto 3 -	Manutenção das tartarugas em caixas plásticas	51
Foto 4 –	- Manutenção dos hamsters em biotério	52
Foto 5 –	- onco-BCG e meio de Sauton (Frasco maior)	54
Foto 6 –	- Inoculação em tilápia-do-Nilo	54
Foto 7 –	- Inoculação em girino de rã touro	54
Foto 8 –	- Inoculação em tartaruga	55
Foto 9 –	- Inoculação em coxim plantar de hamster	55
Foto 10	– Anestesia	56
Foto 11	- Secção transversal de fragmento de cauda de girino	56
Foto 12	- Colheita de fragmento plantar de tartaruga.	57
Foto 13	- Colheita de coxim plantar de hamster	58
Foto 14	 Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma em tilápia-do-Nilo c 14 dias (A), 28 dias (B) e 42 dias (C) pós-inoculação de BCG na musculatura 	
Foto 15	 Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma em girinos de rã tou gigante com 14 dias (A) e 28 dias (B) pós-inoculação de BCG na musculatura o cauda. Notar aos 28 dias a presença de célula gigante tipo corpo-estranho 	la
Foto 16	 Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma induzido pela inoculação de BCG na musculatura da região plantar de tartarugas da "orelhavermelha". (A) 14 dias, (B) 28 dias e (C) 42 dias. HE 	70
Foto 17	 Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma induzido pela inoculação de BCG no coxim plantar hamsters aos 14 dias (A), 28 dias (B) e 42 dias (C). HE 	
Foto 18	 Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente pela inoculação de BCG na musculatura de tilápias-do-Nilo com 14 dias de evolução. Observar marcação castanho-dourada em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:100 	,

Foto 19	- Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente pela inoculação de BCG na musculatura de tilápias-do-Nilo com 14 dias de evolução. Observar que não houve marcação em células do controle negativo
Foto 20	Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em cauda de girino de rã touro-gigante, com 28 dias pósinoculação de BCG. Observar marcação castanho-dourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:10074
Foto 21	Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em cauda de girino de rã touro-gigante, com 28 dias pósinoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo
Foto 22	- Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em região plantar de tartaruga, com 28 dias pós-inoculação de BCG. Observar marcação castanho-dourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:50
Foto 23	- Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em região plantar de tartaruga, com 28 dias pós-inoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo
Foto 24	Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em coxim plantar de hamster, com 42 dias pós-inoculação de BCG. Observar marcação castanho-dourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:50
Foto 25	- Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em coxim plantar de hamster, com 42 dias pós-inoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo76

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	22
REVISÃO DE LITERATURA	28
I CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO	28
1 ASPECTOS GERÁIS	28
2 SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO	29
3 MECANISMOS DE ACÃO DO ÓXIDO NÍTRICO	32
II PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS	33
III PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIA:	SE
MEDIADORES QUÍMICOSIV O GRANULOMA INFLAMATÓRIO: ASPECTOS GERAIS	39
MATERIAL E MÉTODO	
I ANIMAIS	
1 PEIXES	
2 ANFÍBIOS	
3 RÉPTEIS	
4 MAMÍFEROS	
II TRANSPORTE	
III MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO	
1 LABORATÓRIO	40
1.1 PEIXES E GIRINOS	
1.2 TARTARUGAS	
2 BIOTÉRIO	
3 TEMPERATURA	
4 GRUPOS EXPERIMENTAIS	
IV TRATAMENTO EXPERIMENTAL	
1 INÓCULOS	
1.1 BCG	
1.2 VEÍCULO	
2 INOCULAÇÃO	54
3 COLHEITA DO MATERIAL	55
3.1 PEIXES E GIRINOS	
3.1.1 Anestesia e Eutanásia	
3.1.2 Histopatologia e Imunoistoquímica	56
3.2 TARTARUGAS	
3.2.1 Anestesia e Eutanásia	
3.2.2 Histopatologia e Imunoistoquímica	
3.3.1 Anestesia e Eutanásia	
3.3.2 Histopatologia e Imunoistoquímica	
4 HISTOPATOLOGIA	
4.1 MÉTODO DA HEMATOXILINA-EOSINA	59
5 IMUNOISTOOUÍMICA	59
6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	61
RESULTADOS	62
I ADAPTAÇÃO	62
II TEMPERATURA E UMIDADE	62
III MORTALIDADE	
IV MIGRAÇÃO CELULAR E EVOLUÇÃO DA LESÃO	
1 PEIXES	
2 GIRINOS	
3 TARTARUGAS	
4 HAMSTERS.	
V PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	73
1 PEIXES	
2 GIRINOS	74

3 TARTARUGAS	
4 HAMSTERS	76
DISCUSSÃO	77
I ADAPTAÇÃO E MORTALIDADE	77
II MIGRAÇÃO CELULAR E EVOLUÇÃO DO GRANULOMA	79
I ADAPTAÇÃO E MORTALIDADE II MIGRAÇÃO CELULAR E EVOLUÇÃO DO GRANULOMA III AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	85
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXO I	99

"Para ser grande
Sê inteiro
Nada teu, exagera ou exclui
Sê todo em cada coisa
Põe o quanto és, no mínimo que fazes
Pois assim...
Em cada lago, a lua toda brilha,
Porque alta vive"

Fernando Pessoa

INTRODUÇÃO

O termo inflamação surgiu a partir do latim *inflamare* (= queimar), possuindo uma história rica e antiga, ligada intimamente à história das guerras, das feridas e das infecções. Cornelius Celsus, um escritor romano (século I d.C.), descreveu quatro sinais – dor, rubor, calor e tumor – que ficaram classicamente conhecidos como os "sinais cardeais" da inflamação, aos quais, séculos mais tarde, Rudolph Virchow acrescentou um quinto sinal – perda da função (*functio læsae*) (COTRAN et al., 1998; THOMSON, 1983).

O processo inflamatório foi considerado durante muito tempo uma mazela, até que, em 1793, John Hunter, um cirurgião escocês, afirmou que a inflamação não era uma doença, mas uma "resposta não específica, com efeito salutar para o hospedeiro" (COTRAN et al., 1998).

O estudo da Patologia Comparada da Inflamação foi iniciado pelo zoólogo russo Elie Metchnikoff há aproximadamente 160 anos (METCHNIKOFF, 1968). Este pesquisador, baseado nas teorias da evolução de Darwin-Wallace, verificou que o processo inflamatório é mais simples quanto mais inferiormente estiver localizado o animal na escala filogenética, observando, por exemplo, que as funções de digestão e defesa permaneceram unidas desde os Protozoa até os Platyhelmintes e a partir daí separaram-se, quando os animais passaram a apresentar tubo digestivo completo e células específicas foram selecionadas para atuar na proteção contra agentes injuriantes (RAMOS, 1992).

Rudolph Virchow (1821–1902) criou o conceito de "patologia celular" e um aluno seu, Julius Cohnhein (1839–1884) fez uma das principais descrições microscópicas do processo inflamatório em vasos sangüíneos do mesentério e língua de sapos. Outro pesquisador de relevante importância foi Sir Thomas Lewis que, com base em experiências

simples envolvendo a tríplice resposta na pele, estabeleceu o conceito de que substâncias químicas, induzidas localmente pela lesão, são responsáveis pelas alterações vasculares da inflamação (COTRAN et al., 1998)

Dentre os mediadores químicos que modulam o processo inflamatório, os principais grupos descritos e estudados incluem as proteases plasmáticas, representadas pelo sistema complemento, pelo sistema das cininas e pela cascata da coagulação; os metabólitos do ácido araquidônico gerados tanto pela via enzimática da PGH sintetase (cicloxigenase) - prostaglandinas, tromboxano e prostaciclina, quanto pela via enzimática da lipoxigenase - leucotrienos e 5 HETE (hidroxieicosatetraenóico); aminas vasoativas - histamina e serotonina; fator ativador plaquetário (PAF); e, produtos celulares como as citocinas e linfocinas (COTRAN et al., 1998). Novos mediadores, quase todos descritos *in vivo*, vêm sendo listados quase diariamente, gerando novas linhas de pesquisa a fim de melhor estudá-los e compreender as funções que podem desempenhar (MONTENEGRO, 1999).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que também atua como mediador na resposta inflamatória, cuja descoberta aponta para a década de 80 (COTRAN et al., 1998). Diversos estudos vêm demonstrando que este mediador participa de uma série de processos biológicos muito importantes, tendo sido inclusive denominado "a molécula do ano", em 1992, pelo renomado periódico *Science* (HALUZÍK, 1998; LAZARUS, 2000; PRÓNAI et al., 1996). Há evidências que o óxido nítrico esteja presente em gafanhotos, besouros, caranguejos, moluscos, galinhas, ratos, camundongos, bovinos e humanos (NATHAN; XIE, 1994).

O NO, *in vivo*, é produzido à partir do aminoácido L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas descritas dessa enzima conhecidas como tipo I ou NOS neuronal - nNOS e bNOS, tipo II ou NOS induzida - iNOS, e tipo III ou NOS endotelial - eNOS. Os tipos I e III são enzimas constitutivas (cNOS), ou seja, são presentes

em tecidos normais estando envolvidas com diversas atividades homeostáticas, enquanto que o tipo II é uma enzima cuja produção pode ser induzida por uma série de estímulos (NATHAN; XIE, 1994; SCHIN et al., 2000; SCHMIDT; WALTER, 1994).

As cNOS estão envolvidas em vários processos fisiológicos como neurotransmissão, peristaltismo e regulação da pressão sangüínea. A iNOS é expressa em alguns tecidos sadios como nas vias aéreas superiores de humanos; útero de coelhas prenhes (NATHAN; XIE, 1994) e na implantação do trofoblasto em fêmeas de camundongos (GAGIOTI et al., 2000). Sua maior expressão, contudo, é reservada a processos infecciosos e inflamatórios gerados por diversos produtos microbianos, alguns tipos de células tumorais e numerosas citocinas, podendo estes estímulos agir sinergicamente entre si (NATHAN; XIE, 1994). O óxido nítrico também pode desempenhar papel na patogenia de processos inflamatórios crônicos, processos auto-imunes, doenças degenerativas do sistema nervoso central, formação de tumores e perpetuação da asma (FISH, 1999; HALUZÍK, 1998; LAZARUS, 2000; PRÓNAI et al., 1996). Em relação à resposta inflamatória granulomatosa, característica em diversas enfermidades crônicas como esquistossomose e tuberculose, foi observado que a produção de óxido nítrico por macrófagos ativados constitui-se em importante fator para que haja a organização do padrão lesional (KREUGER et al., 1998).

Nathan e Xie, 1994, concluíram seu trabalho propondo que, para o futuro, as pesquisas deverão voltar-se a quatro aspectos principais: bioquímica das NOSs; manipulação genética, alteração e administração de NOSs aos animais; variação dos tipos, alelos, tipos celulares e estímulos regulatórios da expressão de NOS e sua relação com as doenças; e, biologia comparada de NOSs nas diversas espécies animais. Estes pesquisadores acreditam que os trabalhos nessas linhas de pesquisa ajudarão a conhecer as funções e possibilitarão o controle da participação do óxido nítrico.

O Laboratório de Patologia Experimental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo vem desenvolvendo trabalhos na área da Patologia Comparada da Inflamação utilizando os vertebrados ectotérmicos (peixes, anfíbios e répteis) e mamíferos (camundongo e ratos) como animais de experimentação.

Os estudos experimentais nesse laboratório iniciaram-se com trabalhos em peixes. Matushima, em 1988, estudou a cinética da reação inflamatória induzida pela injeção de carragenina na bexiga natatória de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e em 1994 avaliou o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG também em tilápia-do-Nilo.

Catão-Dias, 1987, estudou a influência da temperatura sobre a resposta celular inflamatória induzida experimentalmente por corpo-estranho na cauda de girinos de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*, SHAW - 1802). Catão-Dias e Sinhorini, 1991, observaram que girinos de rã touro-gigante apresentaram resposta inflamatória a corpo-estranho com predominância de células agranulocíticas mononucleares; continuando seus trabalhos, Catão-Dias, 1992, estudou a influência da temperatura ambiente sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã touro-gigante. Seguindo a linha de pesquisa com anfíbios, Gaviolle, 1991, estudou os aspectos morfológicos da interação regeneração-inflamação em girinos de rã touro-gigante e Maiorino, 1999, sugeriu a interação do sistema imune com o processo inflamatório agudo e crônico induzidos, respectivamente, pela inoculação de *Aeromonas hydrophila* e *Mycobacterium marinum* na cauda de girinos de rã touro-gigante.

Ramos, 1992, e Ramos et al., 2001, realizaram avaliações qualitativas, quantitativas e ultra-estruturais da resposta inflamatória induzida experimentalmente por corpo-estranho em

estudaram a cinética celular induzida por implante subcutâneo de lamínulas de vidro em tartarugas tigre-d'água (*Trachemys dorbignyi*), observando a formação de grande quantidade de células gigantes, maiores e mais numerosas em todos os tempos estudados quando comparados aos resultados obtidos com aqueles verificados em mamíferos. Miyaki et al., 1993, inocularam a bactéria *Aeromonas hydrophila*, morta por autoclavação, em patas de tartarugas tigre d'água, verificando a formação de paliçadas de células gigantes ao redor do inóculo e restos necróticos ao 33º dia pós-inoculação. Em prosseguimento aos seus estudos, Ramos, 1997, descreveu a cinética do granuloma induzido experimentalmente pela inoculação de *Mycobacterium marinum* vivo e morto pelo calor, em tartarugas tracajá (*Podocnemis unifilis*, Troschel - 1848).

Maiorino et al., 1996, através do implante subcutâneo de lamínulas de vidro em jacarés-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*), verificaram a presença de macrófagos, células gigantes e células pigmentares, estudando tais células através do método imunoistoquímico.

Estes trabalhos, concomitantemente desenvolvidos, foram muito importantes como modelos para comparação do processo inflamatório entre diferentes espécies animais, na tentativa de melhor compreendê-lo.

O presente trabalho, em continuidade à filosofia do Laboratório de Patologia Experimental e Comparada, e à relevância dos trabalhos publicados nas duas últimas décadas, tem como objetivo principal verificar, qualitativamente, a participação do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso ao longo da escala filogenética através da indução de resposta inflamatória crônica pela inoculação de BCG em peixes - tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), anfibios - girinos de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*), répteis - tartarugas de "orelha" vermelha (*Trachemys scripta elegans*) e mamíferos - hamsters (*Mesocricetus auratus*).

REVISÃO DE LITERATURA

I CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

1. ASPECTOS GERAIS

Compostos nitrogenados têm sido usados de modo terapêutico há mais de um século. O óxido nitroso – N₂O – é um óxido quimicamente estável do nitrogênio, componente do "gás do riso" que foi utilizado durante muito tempo como anestésico (CHAMPE; HARVEY, 1994; STRYER, 1996). Em 1867, Sir Thomas Lauder Brunton reportou a aplicação de nitroglicerina para o tratamento de angina pectoris, entretanto, somente em 1980 descobriu-se que o seu mecanismo de ação estava relacionado à liberação de óxido nítrico a partir de sua molécula (OKITA; MASTERS, 1997). A nitroglicerina também é o componente ativo da dinamite e ironicamente, Alfred Nobel, seu inventor e que originou o prêmio Nobel, sofria de angina pectoris. Em uma carta enviada a um amigo em 1885, ele escreveu:

"Isto soa como ironia do destino que eu esteja sendo obrigado pelo meu médico a usar nitroglicerina" (GARRET; GRISHAN, 1999).

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, altamente tóxico, constituindo uma molécula pequena - NO•, com vida muito curta (de 6 a 10 segundos) e eletricamente neutra, o que possibilita atravessar a membrana plasmática por difusão simples (CAMPBELL, 2000; CHAMPE; HARVEY, 1994; STRYER, 1996). O óxido nítrico não necessita de um receptor

específico, nem de um canal protéico, estando livre para transitar e atuar em diversos sítios (CAMPBELL, 2000). Devido a tais características, é uma molécula adequada para atuar como sinalizador intracelular e entre células vizinhas (CAMPBELL, 2000; STRYER, 1996).

2. SÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é produzido endogenamente a partir do grupo guanidino da Larginina, um aminoácido de ocorrência natural. A reação ocorre pela ação de enzimas denominadas "óxido nítrico sintases", tendo como produtos, além do óxido nítrico, L-citrulina e NADP⁺ (Figura 1).

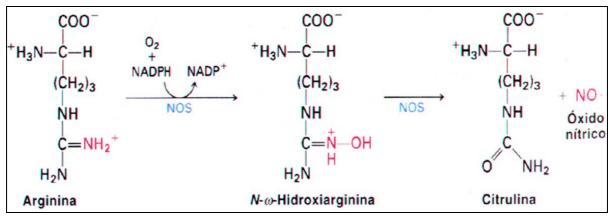


Figura 1. Síntese do óxido nítrico (STRYER, 1996).

As NOSs possuem constituição ligeiramente diferente, dependendo das células onde se encontrem. As formas constitucionais e induzidas são estruturalmente muito parecidas, sendo formadas por dímeros contendo duas subunidades idênticas, com pesos moleculares variando de 130.000 a 150.000 dáltons. A arquitetura molecular, independentemente da isoforma em questão, contempla quatro grupos prostéticos: dinucleotídeo de flavina-adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN), heme e tetraidrobiopterina (BH₄) (CAMPBELL,

2000). As formas neuronal e endotelial ainda possuem domínios de ligação Ca⁺²/Calmodulina e, à nNOS, adiciona-se um grupo constituído de quatro aminoácidos (Glicina-Leucina-Glicina-Fenilalanina – GLGF) na região amino-terminal (Figura 2) (OKITA; MASTERS, 1997).

A óxido nítrico sintase induzida – iNOS – foi estruturalmente decifrada por Dennis Stuehr e John Tainer, verificando-se a forma dimérica do domínio oxigenase. Cada monômero apresenta-se alongado e curvo, com um incomum domínio único de ligação α - β , cujo formato lembra uma luva de *baseboll*. O grupo heme essencial fica mantido na região central junto ao plano de ligação β , com sua face distal direcionada para uma grande cavidade (Figura 3) (GARRET; GRISHAN, 1999).

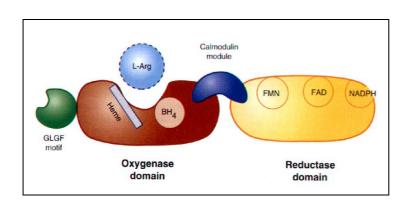


Figura 2 – Estrutura molecular da nNOS (OKITA; MASTERS, 1997, p.997).

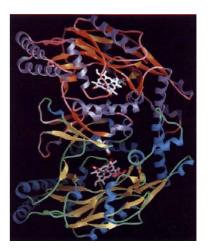


Figura 3 – Estrutura molecular da iNOS (GARRET; GRISHAN, 1999, p. S-32)

As diferentes isoformas de NOSs possuem mecanismos próprios para a síntese do óxido nítrico (CAMPBELL, 2000; GARRET; GRISHAN, 1999; OKITA; MASTERS, 1997).

O processo enzimático da nNOS (neuronal) e eNOS (endotelial) caracteriza-se por uma reação de monoxigenação semelhante àquela catalizada pelos citocromos P450, e é

totalmente dependente da ligação de calmodulina, que requer grande influxo de cálcio. As moléculas de oxigênio que são incorporadas à L-citrulina e ao NO• derivam do oxigênio atmosférico. Foi constatado que a oxigenação ocorre pela mediação de BH4, que é um cofator necessário durante toda a reação, e que ocorrem interações entre os domínios hemeproteicos e flavoproteicos da enzima. O fluxo de elétrons depende do NADPH, que doa dois elétrons para o sítio FAD, que por sua vez reduz o FMN. O FMN atua sobre o grupo prostético heme, reduzindo-o a Fe⁺², que desta forma pode ligar o oxigênio que será usado na oxigenação da L-arginina. A calmodulina atua mediando o fluxo de elétrons entre os grupos flavínicos FAD e FMN no módulo redutase da NOS, e entre os grupos FMN e heme no módulo oxigenase da enzima (OKITA; MASTERS, 1997). Em tecido cerebral, propõe-se que a citrulina seja o produto exclusivo do metabolismo das nNOS, pelo fato do ciclo da uréia ser incompleto no cérebro, possibilitando a utilização de técnicas que demonstrem sua presença como método para o estudo da atividade e função da nNOS (KEILHOFF et al., 2000).

O mecanismo de síntese nas iNOSs difere das demais por ser cálcio-independente. O estímulo para o processo requer a ligação de mediadores estimulatórios (por exemplo, citocinas e TNF) a receptores específicos na membrana das células inflamatórias, iniciando uma série de eventos que levam à ativação dos processos de transcrição no núcleo da célula, produzindo o RNA mensageiro da enzima que é, em seguida, sintetizada no citoplasma. Devido a este tipo de mecanismo sintético a enzima é conhecida como *induzível - iNOS* (CAMPBELL, 2000).

3 MECANISMOS DE AÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO

Dentre os modos de ação do óxido nítrico é relevante sua atuação como vasodilatador. O NO produzido no endotélio difunde-se para as células musculares lisas da túnica média, nas quais é ativada a forma citosólica da adenilato ciclase. O aumento de GMPc resultante provoca relaxamento muscular, possivelmente através da ativação da proteína quinase G que, por sua vez, fosforila a quinase de cadeia leve da miosina tornando-a inativa (STRYER, 1996). Atribui-se ao NO derivado de células endoteliais propriedades antiinflamatórias por inibir o "rolling" e adesão leucocitária, bem como a expressão de moléculas de adesão, particularmente ICAM-I e VCAM-I. Também, verificou-se que o óxido nítrico deprime sinais de estresse oxidativo pela inibição local de angiotensina II em vasos sangüíneos (TEDGUI; MALLAT; 2001).

No sistema nervoso é atribuída ao NO a capacidade de difusão através das membranas das células cerebrais para outros neurônios, reforçando as conexões nas rotas neuronais. O próprio óxido nítrico serviria como um sinal intracelular ou poderia induzir a formação de outra molécula sinalizadora, questão ainda em investigação (CAMPBELL, 2000).

Em relação à ativação imune e sua ação em células tumorais, o NO produzido por macrófagos interfere em processos celulares cujas taxas metabólicas são elevadas nas células cancerosas. Um sítio de ação é a inibição da enzima aconitase que catalisa uma das etapas iniciais do ciclo do ácido cítrico; também interfere com o Complexo I da cadeia de transporte de elétrons e, outro sítio de atuação, é a inibição da enzima ribonucleotídeo-redutase, impedindo a redução dos ribonucleotídeos em desoxirribonucleotídeos, interferindo, portanto, com a síntese de DNA na célula neoplásica (CAMPBELL, 2000).

II PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO EM PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS

Devido ao interesse corrente a respeito da biologia do óxido nítrico em processos fisiológicos e patológicos de animais e seres humanos, iniciaram-se pesquisas envolvendo os mais variados filos como método para compreensão das suas funções, uma vez que se verificou a precoce participação filogenética dessa molécula até mesmo em animais invertebrados como ouriço-do-mar (COX et al., 2001), insetos e crustáceos (LAING et al., 1996).

A comprovação da produção de óxido nítrico pelos peixes vem sendo norteada por pesquisas experimentais que se valem de técnicas avançadas como imuno-histoquímica e reação de polimerase em cadeia — PCR. Em cultura de macrófagos de peixe-dourado (*Carassius auratus*), a síntese desse mediador foi induzida pela incubação com lipopolissacarídeo de membrana (LPS) de *Escherichia coli* durante 48 horas, após as quais extraiu-se o RNA celular e este foi submetido à reação padrão de PCR, utilizando-se *primers* de diferentes isoformas de NOS; como resultado comprovou-se a expressão de seqüências de RNA mensageiro (mRNA) que codificam iNOS, estreitamente relacionadas às de mamíferos (LAING et al., 1996). Após a estimulação *in vitro* de culturas celulares de macrófagos e *in vivo* pela inoculação de *Aeromonas salmonicida* em trutas arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*) observou-se a expressão de iNOS, verificando-se após o seqüenciamento pela técnica de PCR que ocorre 75% de homologia com os aminoácidos de iNOS de mamíferos (LAING et al., 1999). Estudos filogenéticos em cérebro, coração, figado e baço de peixes marinhos teleósteos

(*Stenotomus chrysops*), revelaram 91% de identidade das nNOSs em relação à mesma enzima nos mamíferos, particularmente em relação aos domínios de ligação de calmodulina (COX et al., 2001).

Experimentos utilizando BCG para estimular a resposta inflamatória vêm sendo realizados em peixes antárticos (*Notothenia coriiceps*), nos quais, através do implante de lamínulas de cristal na cavidade celomática após inoculação intracavitária de suspensão de BCG, pôde-se observar adesão macrofágica e formação de células gigantes multinucleadas originadas pela fusão dos macrófagos, constatando-se a manutenção da capacidade fagocítica nessas últimas células (SILVA et al., 2002)

Uma vez comprovada a produção desse mediador pelos peixes, esforços voltaram-se para a compreensão dos locais de síntese e das possíveis funções. Através de imunoistoquímica, pela incubação com anticorpos anti-iNOS de coelho, e pela técnica de imunofluorescência, foi realizado estudo em retina de peixe-zebra (*Brachydanio rerio*) verificando-se maior expressão da enzima nas camadas de células ganglionares, plexiforme interna e externa e fotorreceptora, especulando-se uma possível função compensatória na ausência de nNOS nesses sítios. Ainda em trutas arco-íris, após desafío com um patógeno gram positivo – *Renibacterium salmoninarum*, comprovou-se através da reação de PCR a presença de iNOS precocemente em tecidos linfóides presentes nas guelras (entre 3 e 6 horas pós-inoculação) e mais tardiamente em rins, variando em quantidade de acordo com a patogenicidade da cepa, atribuindo-se a esta molécula uma possível função protetora contra agentes microscópicos, participando da resposta imunológica (CAMPOS-PEREZ et al., 2000).

A produção de iNOS em granulócitos do rim cranial, e em neutrófilos e macrófagos hepáticos de trutas arco-íris, foi constatada após a inoculação intraperitonial e intravenosa de

cepas atenuadas de *Aeromonas salmonicida* e *Yersinia ruckerii*; a comprovação ocorreu através de histoquímica, imunoistoquímica, métodos eletroforéticos e *imunoblot*, reforçando as teorias sobre sua participação junto ao sistema imune no combate a patógenos (BARROSO et al., 2000). Utilizando-se carpa comum (*Cyprinus carpio*) foram realizados experimentos tendo como método a reação de PCR visando o seqüenciamento de iNOS e sua análise filogenética, obtida após inoculação com LPS e *Trypanoplasma borreli*, concluindo-se que houve 57% de correlação com a iNOS humana, conservando os mesmos locais de ligação de cofatores necessários para seu funcionamento, e que os inóculos foram os responsáveis pela síntese de grande quantidade de óxido nítrico (SAEJI et al., 2000).

As revisões bibliográficas sobre a participação do óxido nítrico nos processos inflamatórios de anfíbios e répteis revelaram que pouco se conhece sobre seu envolvimento, sendo que os estudos restringem-se à caracterização e aplicações fisiológicas dessa molécula, como sua participação em neurônios do trato digestório de sapos (*Bufo marinus*); através de imunoistoquímica para NOS e histoquímica enzimática para NADPH-diaforase, comprovouse que ambas são expressas em neurônios da submucosa do intestino grosso em grande quantidade, no intestino delgado, embora em menor valor, e raramente no estômago e esôfago. Estes resultados permitiram concluir que estas enzimas possuem papel fisiológico precoce nos vertebrados e que o óxido nítrico atua como neurotransmissor no trato gastrintestinal de sapos (*LI* et al., 1992). A fim de verificar possível papel do NO na secreção ácido-gástrica de sapos (*Bufo marinus*), experimentos utilizando L-NAME foram realizados, observando-se que a sua adição provocou aumento proporcional na secreção ácida; quando os animais foram tratados com L-arginina, carbacol e pentagastrina, observou-se aumento na síntese de NO e redução na liberação de íons H⁺, não havendo o mesmo efeito quando administrada histamina. Perante esses resultados, foi possível sugerir-se que alterações na

produção de NO na mucosa gástrica podem modular a função das células parietais, e que um mecanismo cálcio-dependente também esteja envolvido (MOLERO et al., 1998).

No trato respiratório de rãs (*Rana temporaria*) verificou-se, através de imunoistoquímica para NOS e histoquímica para NADPH-diaforase no plexo neuronal pulmonar e da cavidade oral, imuno-reatividade tanto em pericários como fibras nervosas, indicando participação filogenética precoce do NO como neurotransmissor periférico (BODEGAS et al., 1995).

Durante a metamorfose dos girinos de *Rana japonica*, a produção de NO é aumentada sob estimulação dos hormônios tireoidianos, relacionando-se à apoptose dos miócitos durante a regressão da cauda (KASHIWAGI et al, 1999).

O mimetismo revelado pelas alterações na coloração da pele de rãs (*Xenopus laevis*) é produzido pela migração de grânulos de pigmentos em melanóforos, cuja regulação depende de hormônio melanotrópico produzido pela *pars* intermédia hipofisária, que por sua vez estão sob controle de substâncias hipotalâmicas, principalmente dos núcleos supraquiasmático e magnocelular e *locus ceruleus*. Através de imunoistoquímica para NOS e histoquímica para NAD-diaforase, observou-se imuno-reatividade para NOS em neurônios do teto óptico e *locus ceruleus*; reatividade para NAD-diaforase foi constatada também em neurônios da amídala lateral, núcleo ventral hipotalâmico e fibras da eminência média. Ainda, verificou-se marcação para b-NOS em fibras da *pars* intermédia e reatividade para NAD-diaforase em células endoteliais da hipófise; estes resultados sugerem que possa haver neurônios que sintetizam NO em centros cerebrais que regulam a atividade da *pars* intermédia pituitária (ALLAERTS et al., 1997). Outros estudos também envolvendo hipófise, em rãs (Rana esculenta), propõem que o óxido nítrico media a secreção basal e induzida por GnRH de gonadotrofinas durante o ciclo reprodutivo, com maior expressão na fase de ovulação

(GOBBETTI; ZERANI, 1998). Resultados equivalentes foram obtidos analisando-se a secreção de gonadotrofinas mediada por NO em tritões machos (*Triturus carnifex*) (GOBBETTI; ZERANI, 1999).

Em cultura de células da *pars* intermédia da hipófise de *Xenopus laevis* desafiadas com LPS, foi demonstrada a presença de óxido nítrico através de imunoistoquímica, em melanótropos e células estreladas sugerindo uma possível participação como mecanismo protetor contra estresse oxidativo e em processos inflamatórios sistêmicos (ALLAERTS et al., 2000).

Estudos imunoistoquímicos envolvendo medula espinal de rãs (*Rana perezzi*) revelaram extensa população de neurônios nitrérgicos em corno dorsal e substância cinzenta intermediária, ocorrendo também em áreas do corno ventral e, ocasionalmente, em motoneurônios somáticos. Numerosas fibras positivas foram observadas na substância branca medular, especialmente nos funículos dorsal e dorsolateral, e um agrupamento especial de axônios ocorreu no trato de Lissauer formando um sistema colateral. Estes resultados contrastaram com a disposição em mamíferos aventando questões relativas ao desenvolvimento evolucionário funcional de neurônios medulares (MUÑOZ et al., 2000).

Paralelamente aos estudos realizados em animais ectotermos, trabalhos ansiando os mesmos objetivos foram desenvolvidos utilizando-se animais de laboratório convencionais, resultando no desenvolvimento de modelos experimentais que possibilitaram maior compreensão sobre a atividade do NO e permitindo o desenvolvimento de novos trabalhos intencionando a descoberta de métodos capazes de regular seu metabolismo. Através do modelo de inflamação hepática crônica induzida por inoculação de *Corynebacterium parvum* em camundongos, utilizando-se técnicas de imunoistoquímica e espectroscopia por ressonância elétron-paramagnética observou-se a presença de marcação em citoplasma de

hepatócitos, detectando-se o envolvimento do complexo citocromo P450. Pôde-se, com isso, aventar um possível papel para esse sistema enzimático durante o processo inflamatório hepático (CHAMULITRAT et al., 1995). Em lesões hepáticas crônicas causadas por vírus como os da hepatite B ou C, atribuiu-se ao excesso de produção de NO a intensa lesão celular, que predispôs à formação de neoplasias; a utilização de imunoistoquímica demonstrou marcação de células ovais, endotélio capilar e células musculares em estados pré-neoplásicos e em epitélio de colangiomas e adenocarcinomas hepatocelulares, sugerindo que células ovais possuem papel importante no desenvolvimento e crescimento tumoral pela produção de NO, via iNOS (AHN, 1999). Ainda em relação ao entendimento da biologia dos tumores, verificou-se que cultura de macrófagos peritoniais murinos ativados pela incubação com MCP-1 (proteína quimioatrativa de monócitos-1) demonstrou produção de NO dose e tempo dependente, concomitante ao acréscimo na atividade tumoricida quando cocultivados com mastócitos neoplásicos P815, indicando ser este mecanismos regulado por cálcio/calmodulina (BISWAS, 2001).

O epigalocatequina-galato (EGCG) é um princípio ativo encontrado no chá-verde, cujas propriedades anticarcinogênicas vêm sendo relacionadas à inibição da síntese de óxido nítrico, uma vez que este composto pode atuar como um carcinógeno químico devido a provocar mutações do DNA ou inibição de enzimas que reparam o DNA. O EGCG foi utilizado em cultura de macrófagos peritoniais de camundongos após estimulação com LPS de *Salmonella typhosa* e IFN-γ e através da reação de PCR avaliou-se a expressão e a atividade de iNOS; os resultados revelaram que houve inibição da síntese de NO tanto pela inibição da expressão gênica quanto pela inibição da atividade enzimática (CHAN et al., 1997).

Procurando-se compreender a participação do óxido nítrico na artrite em ratos, por meio da inoculação de adjuvante obtido a partir de *Mycobacterium butyricum*. A avaliação da produção de óxido nítrico foi realizada através da quantificação do nível de nitrito/nitrato plasmático, atividade enzimática da iNOS e imuno-análise de material esplênico por *western blot*, cujos resultados foram submetidos à verificação estatística. Ainda, foi aplicado N-iminoetil-L-lisina (L-NIL – inibidor da atividade da iNOS) em grupos no tempo zero e 14 dias pós-inoculação. Os resultados demonstraram que só houve inibição da resposta no grupo tratado no tempo zero, sugerindo que a atividade da iNOS restringiria-se aos tempos iniciais da resposta imunológica e que o seu produto – NO - não mediaria a inflamação crônica e a lesão articular, restritas às fases mais tardias, nesse modelo (FLETCHER et al., 1998).

III PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS E MEDIADORES QUÍMICOS

A produção de óxido nítrico em células endoteliais vem sendo largamente pesquisada, dado o seu envolvimento na fisiopatologia de diversas doenças como aterosclerose e diabetes. Uma das formas de indução de sua expressão ocorre pela liberação de interleucina-β, que ativa iNOS no endotélio. Altos níveis de glicose sangüínea, como verificados no diabetes, induzem maior liberação de interleucina-β. Com a finalidade de se estudar métodos de controle das alterações vasculares, foi pesquisada a influência do estradiol sobre a atividade da iNOS em cultura de células endoteliais incubadas com níveis normais e altos de glicose, observando-se que, em ambos os casos, houve inibição de iNOS induzida pela interleucina-β,

podendo ser este um dos mecanismos protetores do estradiol contra complicações cardiovasculares associadas ao diabetes (XU et al., 1999).

Durante os processos inflamatórios agudos e crônicos ocorre aumento na síntese de NO devido à ativação de iNOS em células que participam da resposta. Os polimorfonucleares (PMNs), como os neutrófilos, são células que participam com maior evidência da inflamação aguda. Foi constatado que PMNs circulantes de ratos e humanos não revelam RNAm para iNOS ou mesmo atividade enzimática. Já em células de ratos ativadas pela injeção intraperitonial de glicogênio de ostra constatou-se aumento crescente na expressão de RNAm para iNOS após 4 e 6 horas, sendo 20 a 30% da atividade enzimática cálcio-dependente. Em humanos, tanto PMNs obtidos da extração de sangue periférico quanto de amostras colhidas a partir de pacientes com peritonite não demonstraram expressão gênica para iNOS, permitindo concluir que deve haver variação no mecanismo de indução gênica de ambas as espécies (MILES et al, 1995).

Quatro horas após desafio com LPS, polimorfonucleares foram colhidos de sangue periférico e da cavidade peritonial de ratos observando-se aumento da atividade de NOS em ambos os casos, tornando mais eficiente o transporte e utilização da L-arginina, promovendo a produção de radicais livres, enzimas antioxidantes e aumentando a atividade da mieloperoxidase. A atividade da NOS também aumentou a produção de radicais livres induzidos pelo ácido araquidônico, comprovando-se tal fato através da utilização de um inibidor de NOS, com conseqüente redução na produção desses elementos. Esses resultados indicaram que o aumento de radicais livres após desafio com LPS pode ser regulado pela atividade do óxido nítrico e da mieloperoxidase (SETHI et al., 2001).

Os mastócitos são células relacionadas aos processos de hipersensibilidade e participam da fisiopatologia do crescimento neoplásico e desenvolvimento de metástases. Foi

comprovado que possuem efeito indireto na participação do óxido nítrico, pois o produto de seus grânulos atua sobre macrófagos inibindo a produção de óxido nítrico e de fator de necrose tumoral (TNF-α), além de possuir também efeito degradativo sobre o TNF-α préformado (LI, et al., 1998).

Considerando-se que a inflamação granulomatosa é constituída predominantemente por macrófagos e células epitelióides foi verificada a participação do óxido nítrico neste tipo de reação através da indução do granuloma por inoculação de BCG no coxim plantar de camundongos. Verificou-se que a expressão maior de iNOS relacionou-se às células da periferia do granuloma e que em animais previamente tratados por L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico), houve desarranjo do granuloma e aumento significativo do número de bacilos no citoplasma de macrófagos. Este estudo permitiu concluir que a produção de NO por macrófagos participa da organização do granuloma e controla o crescimento bacteriano em lesões produzidas pelo BCG (KREUGER, 1997).

Numerosos mediadores químicos inflamatórios modulam a indução da síntese de óxido nítrico; as interleucinas (IL), principalmente IL-1, e interferon (IFN), tanto TNF-α como TNF-γ, podem gerar a expressão de iNOS, possuindo importante papel, por exemplo, na patogenia do envenenamento por picada de serpentes jararacas (*Bothrops jararaca* e *Bothrops asper*), em que o NO relaciona-se à destruição tecidual devido a sua capacidade de gerar radicais livres e peroxinitritos e por contribuir com os eventos hipotensores e formação do edema, característicos desse tipo de intoxicação (BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000). Bloqueando-se sua participação através de antagonistas como o L-NAME, verificou-se em artrite induzida pela injeção de veneno de jararaca (*Bothrops jararaca*) que há diminuição expressiva de alguns sinais inflamatórios agudos como infiltrado celular polimorfonuclear na membrana sinovial, permeabilidade do fluido sinovial e níveis de

NO₂/NO₃ no líquido sinovial. Acredita-se que a liberação de NO, neste caso, deva-se à ativação da bradicinina, comprovando a participação deste na fase aguda do processo inflamatório induzido pelo veneno de jararaca (GUZZO et al., 2000).

O γ-IFN também está relacionado à fisiopatologia da aterosclerose, com efeito inibidor da oxidação do colesterol de baixa densidade (LDL). Comprovou-se que este efeito protetor deve-se à indução da síntese de NO, que é um potente antioxidante. Para tanto, utilizou-se macrófagos de camundongos normais e nocauteados para iNOS através da incubação com L-NAME. Após pré-incubação com γ-IFN e γ-IFN+LPS, essas células foram incubadas com LDL e sua oxidação foi medida em termos da produção de substâncias ácidas reativas tiobarbitúricas (TBARS). Verificou-se que na presença de L-NAME o efeito supressivo do γ-IFN foi abolido, com incremento na produção de TBARS. Este experimento permitiu concluir que o γ-IFN promove oxidação do LDL através da ação de macrófagos quando há restrição na síntese de óxido nítrico (NIU et al., 2000).

A utilização do BCG convencional como vacina permanece ainda controversa, pois ao mesmo tempo que estimula o sistema imunológico, também leva a diversos danos teciduais como induração e ulceração no local da injeção. O efeito protetor desejado requer ativação de macrófagos mediada pela produção de γ-IFN por células T tipo I, CD4+, e este leva à expressão de iNOS e produção de óxido nítrico. Buscando-se novas alternativas, foram verificados os efeitos da utilização de BCG-recombinante indutor de maior expressão de γ-IFN, no modelo de infecção intravenosa em camundongos que induz a formação de granulomas hepáticos. Foram avaliados a expressão de iNOS através de imunoistoquímica e medição de RNAm específico pela técnica de PCR, e grau de fibrose, medida pela quantidade de hidroxiprolina no figado e pela positividade de granulomas à coloração de pró-colágeno tipo I. Os resultados demonstraram que os granulomas assim produzidos foram sítios ativos

de ambas inflamação e fibrose, e que a expressão local de γ-IFN induzida pelo BCG-recombinante resultou em diminuição no número de células iNOS-positivas, na expressão de RNAm para iNOS, eliminação bacteriana mais eficiente e redução na porcentagem de fibrose e danos teciduais (WANGOO et al., 2000).

IV O GRANULOMA INFLAMATÓRIO: ASPECTOS GERAIS

A inflamação é a primeira resposta do hospedeiro para restabelecer o equilíbrio homeostático e ocorre na grande maioria dos animais representados ao longo da escala filogenética. É comum pensar-se em bactérias ou outros microrganismos como desencadeantes do processo inflamatório, porém quase todas as causas de lesão celular, incluindo agentes físicos – queimaduras, radiação e trauma; químicos – substâncias cáusticas; e todos os tipos de reações imunológicas podem provocá-la, além dos agentes infecciosos (COTRAN et al., 1998).

A arena da resposta inflamatória é o tecido conjuntivo vascularizado, incluindo plasma, células circulantes, vasos sangüíneos e os constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo (COTRAN et al., 1998).

É costume dividir-se a inflamação em aguda e crônica, sendo que a primeira é de duração relativamente curta, levando desde poucos minutos a até um ou dois dias, e suas características principais são a exsudação de líquido e de proteínas do plasma, gerando edema, e a migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos, sendo mais ou menos estereotipada, seja qual for a natureza do agente químico (COTRAN et al.., 1998).

A resposta inflamatória crônica pode ser desencadeada pela persistência de agentes infecciosos na lesão, pela exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos ou pelo

desenvolvimento de reações auto-imunes, prolongando-se por semanas, meses ou até mesmo anos (MONTENEGRO, 1999). Curiosamente, o processo inflamatório crônico pode começar insidiosamente como uma resposta lenta, de baixo grau, que nunca adquire aspectos clássicos da inflamação aguda, como o que acontece em algumas das doenças comuns e incapacitantes, tais como artrite reumatóide, doença pulmonar crônica e tuberculose (COTRAN et al., 1998).

As características histológicas da inflamação crônica incluem a infiltração por células mononucleares, principalmente macrófagos, linfócitos e plasmócitos, proliferação de fibroblastos, neovascularização e aumento do tecido conectivo (fibrose). Alguns agentes provocam um padrão distinto de reação inflamatória crônica referido como inflamação granulomatosa, que ocorre em doenças de elevada importância em saúde pública como a lepra, a esquistossomose e a tuberculose (COTRAN et al.., 1998).

O granuloma é uma forma específica de resposta inflamatória crônica e em muitos aspectos ainda é considerado um mistério. Na década de 60 muitos esforços voltaram-se a fim de compreender a biologia desse processo e muito foi descoberto em relação aos seus componentes; contudo, definir um granuloma não trata-se de tarefa fácil (ADAMS, 1976; MARIANO, 1995).

O granuloma clássico descrito por Aschoff constitui-se numa formação nodular com centro necrótico, células mononucleares (monócitos e macrófagos) dispostas concentricamente, entre as quais encontra-se um tipo característico denominado célula epitelióide (devido a sua semelhança com células da pele), além de polimorfonucleares e células gigantes multinucleadas. Estas células são rodeadas por "small round cells" ou pequenas células arredondadas, que são macrófagos sensibilizados recém migrados ou linfócitos. Ainda, na periferia da lesão podem ser encontrados fibroblastos e fibrócitos (ADAMS, 1976; MARIANO, 1995).

Alguns autores costumam dividir didaticamente o granuloma em fases ou estágios de formação, sendo frequentemente reconhecidos três: desenvolvimento de infiltrado inflamatório mononuclear contendo fagócitos jovens, maturação e agregação dessas células em um granuloma maduro e evolução para um granuloma epitelióide (ADAMS, 1976).

Na década de 70, Warren classificou os granulomas em imunológicos e não-imunológicos, sendo que nos primeiros, linfócitos T ativados atuariam na reação inflamatória liberando linfocinas que atrairiam os macrófagos para o foco, determinando seu acúmulo; nos segundos, os agentes inertes como sílica, vidro e talco, provocariam resposta inflamatória aguda e os macrófagos migrariam para o foco atraídos pelos produtos liberados por polimorfonucleares, formando assim, o granuloma. A gênese dos granulomas imunológicos, contudo, vem sendo discutida e, mais recentemente foi demonstrado que os linfócitos T, apesar de atuarem na modulação do processo, não são fator essencial para a formação dos mesmos. Ainda faz-se necessário melhor compreender qual ou quais substâncias induzem a agregação de macrófagos e sua transformação em células epitelióides (MARIANO, 1995).

Uma evidência para explicar a manutenção do granuloma tem surgido com a descoberta do fator desativador de macrófagos (MDF) que pode ser produzido por células antigas presentes na lesão. Foi demonstrado que o MDF apresenta semelhança bioquímica com a MRP-14, uma proteína ligadora de cálcio que é produzida por células epitelióides e desativa macrófagos no foco do granuloma através de um mecanismo ainda desconhecido. Esta hipótese tenta explicar a manutenção das lesões tuberculosas, apesar da existência de mecanismos imunológicos periféricos (AGUIAR-PASSETI et al., 1997). Outra teoria relativamente recente, desenvolvida após estudos sobre a tuberculose pulmonar humana e, particularmente, em pacientes aidéticos com tuberculose pulmonar disseminada, discutiu a capacidade de algumas micobactérias, como a cepa virulenta H37Rv, induzirem apoptose em

monócitos e macrófagos no granuloma, provocando a persistência deste (PLACIDO et al., 1997).

Vem sendo demonstrado que a resposta inflamatória granulomatosa surge como resposta a certos agentes injuriantes precocemente ao percorrer-se a escala filogenética. Há descrições do granuloma em peixes (BRUNO et al., 1998; CHINABUT et al., 1990; DIAMANT et al., 2000; DUNBAR; HERMAN, 1971; GAUTHIER, 2003; MATUSHIMA, 1994; PARISOT, 1958; WOLF; SMITH, 1999), anfibios (BARROS et al., 1988; DARZINS, 1952; MICHICAO; LA PLACA, 1954; MORAES et al., 1996; NONIDEZ; KAHN, 1934; NONIDEZ; KAHN, 1937; RAMAKRISHNAN; FALKOU, 1994; SCHWABACHER, 1959; SHIVELI et al., 1981; SOUZA, 1993) e répteis (BROWNSTEIN, 1984; FOWLER, 1986; FRYE, 1981; FRYE, 1991; MONTALI, 1988; MYIAKI et al., 1993; OLSON; WOODARD, 1974; QUESENBERRY et al., 1986; RAMOS, 1992; RAMOS et al., 2001; SCHRÖDER, 1985; WALLACH; BOEVER, 1983), cujas características morfológicas revelam muita semelhança à lesão em mamíferos (AARUDA et al., 2002; BALIAN, 1995; FERREIRA NETO, 1987; MARIANO, 1995; PERRONE, 1996; PORTUGAL et al., 1990; RICA-CAPELA et al., 2003), com algumas variações em relação à formação de centro necrótico, presença de células gigantes multinucleadas e grau de fibroplasia, na dependência do tipo de agente injuriante, tempo de evolução das lesões e espécie animal acometida (MAIORINO, 1999).

MATERIAL E MÉTODO

I ANIMAIS

1 PEIXES

Foram utilizadas 40 tilápias-do-Nilo (*Oreochromys niloticus*) revertidas, com 7,0 a 10,0 cm de comprimento, obtidas em pesqueiro comercial, no município de Juquiá – SP.

2 ANFÍBIOS

Foram obtidos 40 girinos de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*, SHAW-1802), em ranário comercial no município de Bragança Paulista - SP, entre os estadios 26 a 30 de desenvolvimento (GOSNER, 1960).

3 RÉPTEIS

Foram usadas 30 tartarugas da orelha-vermelha (*Trachemys scripta elegans*), da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, São Paulo – SP, com peso variando de 80 g a 400 g, constituindo grupo de 21 machos e 08 fêmeas.

4 MAMÍFEROS

Foram utilizados 40 hamsters-sírios – variedade Gold (*Mesocricetus auratus*), linhagem HAM, machos, com seis meses de idade, obtidos no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

II TRANSPORTE

Os peixes e girinos foram transportados em sacos plásticos transparentes, com capacidade unitária para 60 litros, adicionando-se oxigênio, e cerrados através de amarração com tiras de borracha. Os sacos foram então acondicionados em uma caixa plástica de modo a contê-los, evitando movimentos bruscos, na tentativa de reduzir ao máximo o estresse do transporte.

As tartarugas foram obtidas após avaliação do projeto pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais – IBAMA e pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Os animais foram acondicionados em caixas plásticas MARFINITE®, sem água e protegidas do sol durante o translado, segundo instruções do biólogo responsável.

III MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO

Os hamsters foram mantidos durante todo o período experimental no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os peixes, girinos e tartarugas foram mantidos durante todo o experimento no Laboratório de Patologia do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Grande ABC.

1 LABORATÓRIO

1.1 PEIXES E GIRINOS



Foto 1 – Manutenção de girinos e peixes no laboratório.

Os peixes e girinos foram estocados durante uma semana em caixa plástica marrom - MARFINITE® - com capacidade para 140 litros (Foto 1). Utilizou-se essa caixa devido a ser leve, facilitando seu manuseio e transporte. A caixa não foi preenchida segundo sua capacidade, evitando-se assim que os animais saltassem. A água usada foi proveniente da rede de abastecimento normal, sem qualquer tratamento prévio, e permaneceu sob oxigenação constante através de compressores de ar - BETA® - ligados a filtros internos revestidos com lã de vidro.

Os girinos e os peixes do grupo controle utilizados no experimento foram transferidos para aquários de vidro com capacidade para 8 litros d'água aproximadamente, com 30 cm x 20 cm x 15 cm, nos quais ficaram sob aeração constante por meio de compressores de ar ligados a filtros internos revestidos com lã de vidro (Fotos 1 e 2). Os peixes do grupo experimental foram acondicionados em caixa plástica marrom - MARFINITE® - com capacidade para 140 litros, na densidade de 0,4 peixes/litro.

Foram mantidos dez girinos por aquário (Foto 2), na densidade de 1,25 girino/litro d'água em coluna d'água de aproximadamente 15 cm, e apenas um peixe por aquário. Os animais foram adaptados durante sete dias antes de iniciar o experimento. Para considerá-los aptos, os critérios adotados foram a não ocorrência de mortalidade, o comportamento e a alimentação. Desse modo, como não ocorreu mortalidade, e já no segundo dia os animais começaram a se alimentar normalmente, pôde-se considerá-los adaptados para o início do experimento ao sétimo dia.

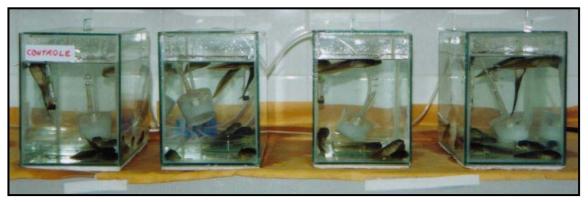


Foto 2. Manutenção de girinos em aquários.

A limpeza dos filtros tanto na caixa de estocagem como nos aquários foi realizada três vezes por semana. Devido a uma possível contaminação pelo extravasamento do inóculo, foi instilada uma solução de formol a 10% sobre toda a lã de vidro retirada, antes de descartá-la.

Uma vez por semana, cerca de 70% da água dos aquários foi retirada sendo substituída por água limpa. Em algumas situações nas quais ocorria demasiada turvação da água, esse procedimento foi repetido mais freqüentemente. A água retirada dos aquários foi tratada com 1% de solução de formol a 10% por 24 horas para desinfecção, antes de ser desprezada na rede de esgoto.

Após o sacrificio dos animais, por ocasião da colheita de material, os aquários e os instrumentos neles contidos (aquecedores, termostatos, filtros, lã de vidro e mangueiras) permaneceram sob solução de hipoclorito de sódio a 2% - CÂNDIDA® - para desinfecção.

Os girinos foram alimentados diariamente com ração comercial para girinos (PRIMOR®), previamente triturada e peneirada obtendo-se farelo semelhante a "fubá mimoso", com partículas de aproximadamente 0,42 mm de diâmetro (MANDELLI Jr. et al., 1985) e os peixes também foram alimentados diariamente com ração comercial peletizada (GUABI®) para alevinos.

1.2 TARTARUGAS



Foto 3. Manutenção das tartarugas em caixas plásticas.

As tartarugas foram hospedadas em caixas plásticas brancas - MARFINITE® - com capacidade para 60 litros. Utilizou-se essa caixa devido à facilidade para seu manuseio e limpeza. A caixa foi mantida inclinada com lâmina d'água suficiente para submersão (Foto 3).

Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial peletizada (REPTOMIX®), com cerca de cinco "pellets" por tartaruga, correspondendo a

aproximadamente 25 gramas, e a limpeza foi realizada diariamente. Após o sacrifício dos animais, por ocasião da colheita de material, as caixas permaneceram sob solução de hipoclorito de sódio a 2% - CÂNDIDA® - para desinfecção.

2 BIOTÉRIO



Foto 4 – Manutenção dos hamsters em biotério.

No biotério, os hamsters foram mantidos sob padrão sanitário convencional controlado, com temperatura de 22 ± 2 °C, umidade relativa variando de 45 a 65% e ciclo de luz de 12 horas de claro por 12 horas de escuro (acendimento automático às 6:00 h, apagando às 18:00 h).

Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno de 40 cm x 34 cm x 17cm. A troca de cama foi realizada duas vezes por semana com maravalha de pinus autoclavada, e a alimentação foi fornecida *ad libitum* com ração comercial NUNILAB-CRL® (NUTRIVITAL NUTRIENTES LTDA), assim como a água, disponibilizada em bebedouros convencionais, após filtração e autoclavagem (Foto 4).

3 TEMPERATURA

As temperaturas do ar (máxima e mínima) e da água, bem como a umidade do ar, foram anotadas diariamente por volta das 13:00h (vide anexo 1).

4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

QUADRO 1 – DISTRIBUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

	NÚMERO DE ANIMAIS			
GRUPOS	PEIXES	GIRINOS	TARTARUGAS	HAMSTERS
GRUPO CONTROLE	10	10	06	10
14d PÓS-INOCULAÇÃO	10	10	08	10
28d PÓS-INOCULAÇÃO	10	10	08	10
42d PÓS-INOCULAÇÃO	10	10	08	10

IV TRATAMENTO EXPERIMENTAL

1 INÓCULOS

1.1 BCG

Utilizou-se ONCO-BCG, Lote n°. 0210105, contendo 40 mg de bactérias / 5ml, doado pela Divisão de Desenvolvimento, Tecnologia e Produção do Instituto Butantã (Foto 5).

1.2 VEÍCULO

Para os grupos controle foi utilizado o meio de Sauton - Lote nº 1B136/02, também do Instituto Butantã, empregado para diluição do onco-BCG (Foto 5).



Foto 5 – onco-BCG e meio de Sauton (frasco maior).

2 INOCULAÇÃO

As inoculações foram realizadas com seringas descartáveis estéreis PLASTIPAK[®] tipo tuberculina com agulha microfina 25 mm X 16 mm, BD[®]. A antissepsia do local foi realizada anteriormente pela fricção de algodão embebido em álcool iodado. Após a inoculação, o excesso extravasado foi recolhido com o mesmo algodão usado na antissepsia.

<u>**Peixes**</u>: Foi inoculado 0,05 ml na musculatura do terço distal, na região dorsal, utilizando-se a última mancha como referência (Foto 6).



Foto 6 – Inoculação em tilápia-do-Nilo.



Foto 7 – Inoculação em girino de rã touro.

Girinos: Foi inoculado 0,05 ml na musculatura do terço proximal da cauda, na região mediana (Foto 7).

<u>Tartarugas</u>: Foi inoculado 0,05 ml na musculatura da região plantar direita (Foto 8).



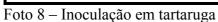




Foto 9 – Inoculação em coxim plantar de hamster.

<u>Hamsters</u>: Foi inoculado 0,05 ml no coxim plantar direito (Foto 9).

3 COLHEITA DO MATERIAL

3.1 PEIXES E GIRINOS

3.1.1 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Para todas as colheitas, os animais foram previamente anestesiados com benzocaína, em solução, na concentração de 1:10.000, adicionando-se em seguida água da torneira até completar o volume de 300 ml em um becker.

Os animais foram colocados no becker, até que entrassem em profunda anestesia (Foto 10), observando-se p3 arada dos movimentos respiratórios e, em seguida, sacrificados por denervação, através de secção medular.



Foto 10 – Anestesia.

3.1.2 HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

Foram feitos cortes transversais na região lateral dos peixes (Figura 4) e na cauda dos girinos (Foto 11), procurando-se isolar no centro do fragmento a região da inoculação.

Todo o material foi fixado em Carnoy (GONG et al., 2004) por 4 horas, passando a seguir para álcool 70°GL, seguindo o processo normal de desidratação e embebição em parafina, para estudos morfológicos e imunoistoquímicos sob microscopia de luz.

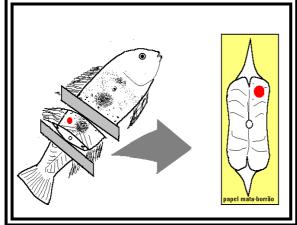


Figura 4. Secção da musculatura de peixe.



Foto 11 - Secção transversal de fragmento de cauda de girino.

3.2 TARTARUGAS

Para a colheita do material dos animais do grupo controle, foi realizado biópsia de fragmento plantar na região da inoculação. Para os animais inoculados com o onco-BCG foi realizada a eutanásia prévia antes da colheita.

3.2.1 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Para a biópsia, os animais foram previamente anestesiados com Tiletamina/Zolazepan – Zoletil[®] 50, na dose de 18 mg/kg, por via intramuscular. Para o sacrifício, os animais foram previamente anestesiados com Tiopental sódico, com sobredose de 200 mg/kg, por via intracelomática e decapitados após a perda das funções vitais.

3.2.2 HISTOPATOLOGIA E IMUNO-HISTOQUÍMICA

O tecido inoculado foi retirado com o auxílio de bisturi, procurando-se isolar no centro do fragmento a região da inoculação (Foto 12).



Foto 12 - Colheita de fragmento plantar de tartaruga.

Todo o material foi fixado em Carnoy (GONG et al., 2004) por 4 horas, passando a seguir para álcool 70°GL, seguindo o processo normal de desidratação e embebição em parafina, para estudos morfológicos e imunoistoquímicos sob microscopia de luz.

3.3 HAMSTERS

3.3.1 ANESTESIA E EUTANÁSIA

Para todas as colheitas, os animais foram previamente sacrificados em câmara de CO₂, em dois ciclos de 15 minutos.

3.3.2 HISTOPATOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

O tecido inoculado foi retirado com o auxílio de bisturi, procurando-se isolar a região da inoculação (Foto 13).

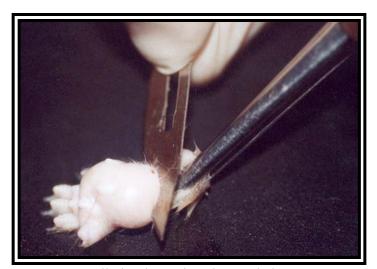


Foto 13 - Colheita de coxim plantar de hamster.

Todo o material foi fixado em Carnoy por 4 horas, passando a seguir para álcool 70°GL, seguindo o processo normal de desidratação e embebimento em parafina, para estudos morfológicos e imunoistoquímicos sob microscopia de luz.

4 HISTOPATOLOGIA

4.1 Método da Hematoxilina-eosina.

As lâminas histológicas foram confeccionadas no Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia da FMVZ - USP. Cortes histológicos de aproximadamente 5 μm foram realizados transversalmente, seguindo a orientação dos primeiros cortes dos fragmentos.

Para o desenvolvimento da coloração de hematoxilina-eosina, os cortes histológicos foram desparafinizados, reidratados por soluções alcoólicas decrescentes até última passagem em água destilada e corados pela hematoxilina. Após passagem em álcool-ácido para diferenciação, seguiu-se coloração pela eosina. Finalmente, o material foi novamente desidratado em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, diafanizado em xilol e montado sob lamínula com resina histológica.

5 IMUNOISTOQUÍMICA

O material foi fixado em Carnoy por quatro horas, após as quais foi transferido para álcool 70°GL, sendo em seguida processado até a inclusão em parafina. Este processamento constituiu-se em desidratação, diafanização e inclusão obedecendo aos métodos de rotina, no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMVZ - USP.

As reações foram realizadas no Laboratório de Análise Toxicológica do Departamento de Patologia da FMVZ - USP, segundo o seguinte protocolo:

⇒ Para anti-iNOS

Desparafinização do material, em lâminas previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxy-silane (SIGMA A-3648 USA®):

PROCEDIMENTO:
30' em estufa a 36°C
Lavar em Xilol (1) – 5'
Lavar em Xilol (2) – 5'
Lavar em Álcool 100 (1) – 5'
Lavar em Álcool 100 (2) – 5'
Lavar em Álcool 95 (1) – 5'
Lavar em Álcool 95 (2) – 5'
Lavar em Álcool $70(1) - 5$
Lavar em Álcool $70(2) - 5$
Lavar com H ₂ O ₂ 6% - 60'.
H_2O_2 6% : diluir H_2O_2 30% em metanol ou água Mili-Q – 1:10.
Ex.: 20 ml de H_2O_2 30% + 80 ml metanol.
Objetivo: bloquear a peroxidase endógena.
Lavar em água destilada – 2' (1)
Lavar em água destilada – 2' (2)
Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 1'a 2'
Obs.: Pode deixar por tempo indeterminado com o PBS.

Secar as lâminas com lenço de papel ou filtro.

Preparar diluição do anticorpo

Diluente do anticorpo: soro fetal bovino (SFB) + PBS 10%

Ex.: 1ml de SFB + 9ml PBS

Foi usado, por exemplo:

- 1:200 para 2ml: 10μl do Ac + 1990μl do diluente
 - ► Cobrir o tecido com a solução
 - ► Controle negativo: só o diluente do anticorpo

Geladeira: "Overnight"

► Colocar em recipiente forrado com espuma (ou papel) umedecida para proteger contra o ressecamento

Lavar com PBS imunoistoquímico no suporte para lâminas – 1'a 2'

Secar as lâminas com lenço de papel ou filtro.

Incubar com Link (1) - 30'

Kit Dako LSAB® + Peroxidase universal – K 0690

Lote 03310 Exp.0304

Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (1)

Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (2)

Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (3)

Secar as lâminas com lenço de papel ou filtro.

Incubar com Streptavidina HRP (2) – 30'

Kit Dako LSAB® + Peroxidase universal – K 0690

Lote 03310 Exp.0304

Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (1)				
Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (2)				
Lavar com PBS para imunoistoquímica não estéril – 5' (3)				
Corar por 20" a 30":				
Diaminobenzidina (DAB) 2,5mg + PBS imunoistoquímico 5ml + H ₂ O ₂ à 30%				
7,5 μl.				
Obs.: Preparar na hora de usar com proteção da luz.				
Ir lavando as lâminas logo em seguida com água destilada.				
Corar (contra-coloração): Hematoxilina por 1'.				
Lavar em água corrente.				
Desidratação dos tecidos:				
Lavar com álcool 70 (1) – 5'				
Lavar com álcool 70 (2) – 5'				
Lavar em Álcool 95 (1) – 5'				
Lavar em Álcool 95 (2) – 5'				
Lavar em Álcool 100 (1) – 5'				
Lavar em Álcool 100 (2) – 5'				
Lavar em Xilol (1) – 5'				
Secar ao ar livre				
Montar sob lamínula com resina histológica				

6 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

O quadro 2 relaciona os fenômenos avaliados à metodologia empregada no estudo do processo inflamatório crônico induzido pela inoculação de onco-BCG.

QUADRO 2 – RELAÇÃO ENTRE A METODOLOGIA EMPREGADA E O FENÔMENO ESTUDADO.

FENÔMENO	METODOLOGIA	
Comportamento dos animais: avaliação	Método: observação diária dos animais.	
da adaptação e alteração do mesmo durante		
o experimento.		
Migração celular: tipos celulares e	Métodos : hematoxilina-eosina.	
cinética inflamatória.		
Evolução da lesão: arranjos lesionais e sua	Métodos : hematoxilina-eosina e técnicas	
evolução.	imunoistoquímicas.	
Avaliação da produção de óxido nítrico:	Método: técnica imunoistoquímica com	
nas lesões induzidas por onco-BCG.	anticorpos anti-iNOS.	

RESULTADOS

I ADAPTAÇÃO

Os animais ectotermos foram considerados adaptados após quatorze dias de manutenção em condições laboratoriais. O critério utilizado observou a não ocorrência de mortalidade e a pronta ingestão ao oferecimento de ração.

Os hamsters foram designados como prontamente adaptados, uma vez que foram gerados em biotério, permanecendo sob condições controladas. Ainda, não foi observado mortalidade ou qualquer outro sinal de doença.

II TEMPERATURA E UMIDADE

As temperaturas no laboratório foram 24°C \pm 4 para a água, 27,5°C \pm 2,5 para a temperatura máxima do ar e 22,5°C \pm 2,5 para a temperatura mínima do ar. A umidade variou de 59% \pm 5, durante todo o período experimental.

III MORTALIDADE

A mortalidade, nos diversos grupos, obedeceu aos dados da tabela 1.

TABELA 1 – MORTALIDADE NOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

	MORTALIDADE				
ANIMAIS	TEMPOS EXPERIMENTAIS				
	14 dias	28 dias	42 dias		
PEIXES	0 %	0 %	0 %		
GIRINOS	30 %	70 %	100 %		
TARTARUGAS	0 %	0 %	0 %		
HAMSTERS	0 %	0 %	0 %		

IV MIGRAÇÃO CELULAR E EVOLUÇÃO DA LESÃO

Em todos os animais observou-se o padrão da resposta inflamatória crônica granulomatosa, considerando-se as variações por espécie. Os tipos celulares puderam ser caracterizados segundo morfologia observada à microscopia de luz.

⇒ <u>Macrófagos</u>: células grandes com formato variável apresentando núcleos arredondados avolumados com cromatina relativamente descondensada, sendo, por isso, fracamente corados e exibindo nucléolo evidente. O citoplasma mostrou-se amplo, podendo-se visualizar, muitas vezes, vacúolos e material fagocitado.

- ⇒ <u>Células epitelióides</u>: células grandes, alongadas, cujos contornos foram indefiníveis à microscopia de luz, apresentando núcleos ovalados, com cromatina frouxa predominante e nucléolos evidentes.
- ⇒ <u>Células com características linfocíticas</u>: pequenas células arredondadas com núcleo arredondado intensamente basofilico ocupando a maior parte do citoplasma.
- ⇒ <u>Fibrócitos / Fibroblastos</u>: células com formato alongado ou fusiforme demonstrando núcleos acompanhando a mesma morfologia. Os fibroblastos foram caracterizados por revelar núcleos mais volumosos e moderadamente mais claros, que nos fibrócitos se apresentaram bastante achatados e intensamente basofilicos.
- ⇒ <u>Células gigantes multinucleadas</u>: células avolumadas apresentando quantidade de núcleos variando de dois a dezenas, classificadas em dois tipos:
 - Tipo Corpo-Estranho: núcleos agrupados geralmente na região central do citoplasma.
 - Tipo Langhans: núcleos dispostos na periferia do citoplasma.
- ⇒ Células pigmentares: células com tamanho e forma variada, de arredondadas a alongadas, contendo pigmento com coloração oscilando entre acastanhada a enegrecida, preenchendo todo o citoplasma e impossibilitando, na maioria das vezes a caracterização nuclear.
- ⇒ <u>Heterófilos</u>: células presentes na reação inflamatória das tartarugas caracterizadas por demonstrarem formas e tamanhos variáveis, de ovais a fusiformes, núcleo periférico com cromatina relativamente densa, e grânulos citoplasmáticos eosinofílicos.

1 PEIXES

- 14 DIAS: Neste primeiro tempo experimental observou-se infiltrado inflamatório multifocal disposto em meio ao tecido muscular; os miócitos ao redor da lesão apresentaram citoplasmas bastante eosinofílicos e com perda das estriações, caracterizando degeneração focal intensa. Edema intersticial pôde ser notado separando a lesão e as fibras musculares. Quanto aos tipos celulares, houve predomínio de células mononucleares, embora tenha sido visualizada, ainda, grande quantidade de células polimorfonucleares. Também foram constatadas células pigmentares compondo o infiltrado (Foto 14 A).
- 28 DIAS: Foi visualizada a formação de centro necrótico rodeado por células mononucleares, destacando-se macrófagos e células epitelióides. Perifericamente foi notada a presença de células com características linfocíticas. Também se observou o surgimento de fibroblastos e aumento na quantidade de células pigmentares circunscrevendo a lesão (Foto 14 B).
- 42 DIAS: Verificou-se aumento expressivo do centro necrótico e maturação do granuloma que demonstrou infiltrado exclusivamente mononuclear disposto concentricamente, com maior quantidade de células epitelióides em meio aos macrófagos. As células com características linfocíticas estiveram presentes na periferia da lesão, assim como as células pigmentares. Ainda, visualizou-se fibroplasia em torno do centro necrótico com discreta deposição de material fibrilar, separando-o do infiltrado epitelióide (Foto 14 C).

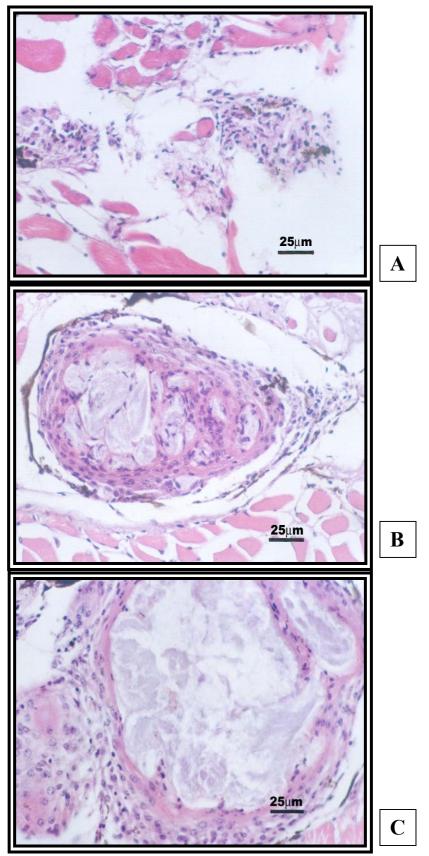


Foto 14 – Fotomicrografías demonstrando a evolução do granuloma em tilápia-do-Nilo com 14 dias (A), 28 dias (B) e 42 dias (C) pós-inoculação de BCG na musculatura.

2 GIRINOS

- 14 DIAS: As lesões caracterizaram-se por agrupamentos celulares compostos por macrófagos em grande quantidade, distribuídos concentricamente ao redor de colônias bacterianas caracterizadas por coloração basofílica e aspecto granular. Células epitelióides apresentaram-se em menor número e células com características linfocíticas foram observadas na periferia, conjuntamente a poucas células polimorfonucleares. Discretos fibroblastos foram visualizados circunscrevendo o infiltrado celular. Também pôde-se constatar degeneração intensa dos miócitos circunjacentes (Foto 15 A).
- 28 DIAS: A formação granulomatosa demonstrou-se mais organizada e formada por múltiplos agrupamentos celulares macrofágicos e epitelióides. A fibroplasia mostrou-se mais pronunciada, com maior número de fibroblastos e fibrócitos dispostos ao redor do infiltrado inflamatório. Células gigantes multinucleadas tipo corpo-estranho estiveram presentes, assim como células pigmentares, embora raras (Foto 15 B).

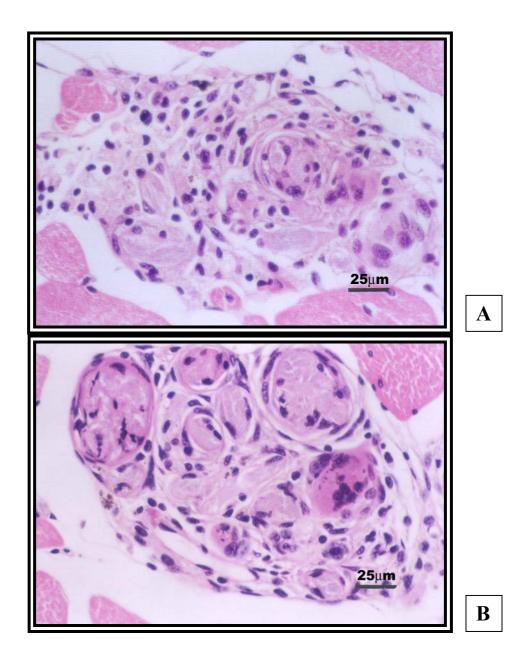


Foto 15 – Fotomicrografías demonstrando a evolução do granuloma em girinos de rã tourogigante com 14 dias (A) e 28 dias (B) pós-inoculação de BCG na musculatura da cauda. Notar aos 28 dias a presença de célula gigante tipo corpo-estranho.

3 TARTARUGAS

- 14 DIAS: Observou-se infiltrado celular mononuclear composto por macrófagos, células com características linfocíticas e diversas células gigantes multinucleadas tipo Langhans apresentando material basofílico fagocitado em seu citoplasma. Grande quantidade de heterófilos puderam ser identificados em meio às demais células inflamatórias (Foto 16 A).
- 28 DIAS: Verificou-se redução no número de heterófilos e expressivo aumento na quantidade de células com características linfocíticas. Grande quantidade de células gigantes multinucleares tanto do tipo Langhans quanto tipo corpo-estranho foram visualizadas contendo material fagocitado no citoplasma, e apresentando tendência a se agruparem (Foto 16 B).
- 42 DIAS: Constatou-se a organização da lesão, com células gigantes multinucleadas dispondo-se em paliçadas ao redor de material necrótico eosinofílico. Também foi evidente o desenvolvimento de fibroplasia circunscrevendo os arranjos celulares e compondo o estroma lesional, no qual pôde-se visualizar grande número de macrófagos, células com características linfocíticas e células epitelióides (Foto 16 C).

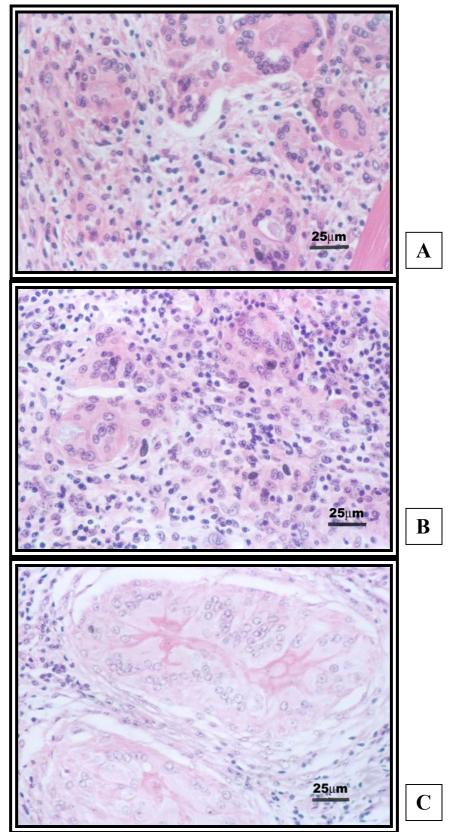


Foto 16 – Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma induzido pela inoculação de BCG na musculatura da região plantar de tartarugas da "orelha-vermelha". (A) 14 dias, (B) 28 dias e (C) 42 dias. HE.

4 HAMSTERS

- 14 DIAS: À microscopia de luz observou-se lesões crônico-proliferativas formadas por severo infiltrado celular mononuclear com grande quantidade de macrófagos e células epitelióides constituindo vários agrupamentos de tamanhos e formas variadas separados por tecido conjuntivo frouxo e entremeados por grande quantidade de polimorfonucleares neutrófilos (Foto 17 A).
- 28 DIAS: Neste tempo experimental verificou-se tendência à organização dos agrupamentos mononucleares, que tornaram-se mais demarcados. O tecido conjuntivo frouxo compôs o estroma da lesão e ainda notou-se infiltrado neutrofílico em meio ao tecido. Raras células gigantes multinucleadas tipo corpo-estranho foram observadas (Foto 17 B).
- 42 DIAS: Os achados histopatológicos revelaram múltiplos granulomas, bem circunscritos, compostos por macrófagos e células epitelióides, contudo sem a formação de centro necrótico. Pôde-se notar material fagocitado no citoplasma de macrófagos. A fibroplasia continuou evidente e constatou-se expressiva redução no infiltrado polimorfonuclear. Células com características linfocíticas foram visualizadas à periferia dos granulomas e em meio ao estroma conjuntivo (Foto 17 C).

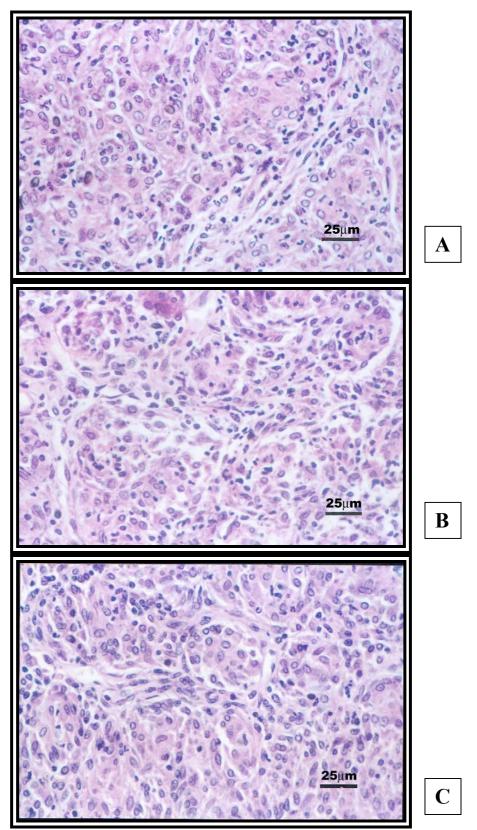


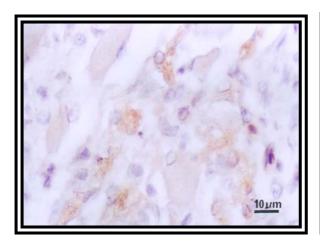
Foto 17 – Fotomicrografias demonstrando a evolução do granuloma induzido pela inoculação de BCG no coxim plantar hamsters aos 14 dias (A), 28 dias (B) e 42 dias (C). HE.

V PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A marcação com anticorpos anti-iNOS foi visualizada através da coloração castanho dourada no citoplasma das células.

1 PEIXES

Verificou-se marcação discreta a moderada em todos os tempos experimentais (Foto 18), quando comparados ao controle (Foto 19), em células mononucleares, nas concentrações de 1:50, 1:100 e 1:200. Na concentração de 1:50 houve maior intensidade na coloração.



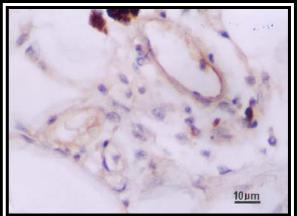
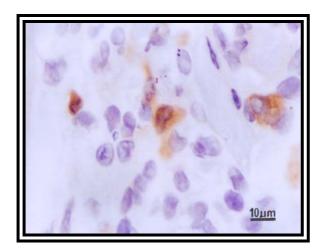


Foto 18 — Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente pela inoculação de BCG na musculatura de tilápias-do-Nilo com 14 dias de evolução. Observar marcação castanho-dourada em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:100.

Foto 19 — Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente pela inoculação de BCG na musculatura de tilápias-do-Nilo com 14 dias de evolução. Observar que não houve marcação em células do controle negativo.

2 GIRINOS

Observando-se os granulomas com 14 dias pós-inoculação, constatou-se que a marcação celular foi extremamente discreta, mas que esta foi expressiva em macrófagos com 28 dias pós-inoculação (Foto 20), nas concentrações de 1:100 e 1:200, quando comparados aos grupos controles (Foto 21). Não foi notada diferença na intensidade da coloração nas diferentes concentrações de anticorpos empregadas.



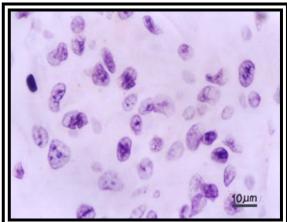
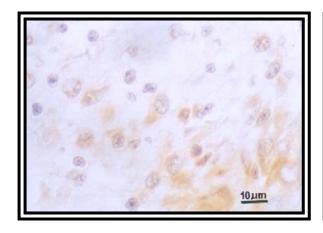


Foto 20 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em cauda de girino de rã touro-gigante, com 28 dias pósinoculação de BCG. Observar marcação castanho-dourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:100.

Foto 21 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em cauda de girino de rã touro-gigante, com 28 dias pósinoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo.

3 TARTARUGAS

Nas lesões de tartarugas também se verificou a marcação de células mononucleares com características macrofágicas desde o primeiro tempo pós-inoculação (Foto 22), estando mais expressiva em 28 e 42 dias, nas concentrações de 1:50, 1:100 e 1:200 de anticorpos anti-iNOS, quando comparados aos grupos controles (Foto 23).



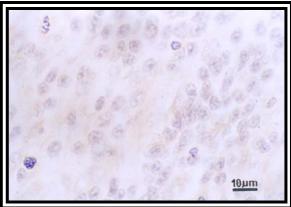
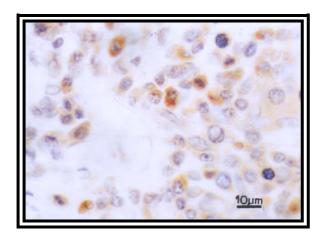


Foto 22 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em região plantar de tartaruga, com 28 dias pós-inoculação de BCG. Observar marcação castanhodourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:50.

Foto 23 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em região plantar de tartaruga, com 28 dias pós-inoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo.

4 HAMSTERS

Os granulomas de hamsters exibiram marcação celular em todos os tempos experimentais (Foto 24 e 25), não havendo diferença expressiva na intensidade de coloração quando comparados os mesmos. Ao longo dos períodos pós-inoculação, verificou-se aumento no número de células marcadas, mais evidente aos 42 dias. A coloração foi mais expressiva nas concentrações de 1:50, 1:100 e 1:200 de anticorpos anti-iNOS.



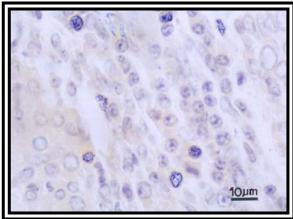


Foto 24 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em coxim plantar de hamster, com 42 dias pós-inoculação de BCG. Observar marcação castanhodourada intensa em macrófagos positivos para anticorpos anti-iNOS na diluição de 1:50.

Foto 25 - Fotomicrografia de reação imunoenzimática em granuloma induzido experimentalmente em coxim plantar de hamster, com 42 dias pós-inoculação de BCG. Observar que não houve marcação em células do controle negativo.

DISCUSSÃO

I ADAPTAÇÃO E MORTALIDADE

A manutenção laboratorial controlada de animais constitui-se num importante fator para o sucesso do experimento, uma vez que produtos hormonais endógenos como glicocorticóides, liberados em situações de estresse alteram processos fisiológicos, interferindo na resposta imunológica (BONAMIN; PAULINO, 1999) e refletindo, muitas vezes, de modo indesejado na cinética do processo inflamatório. Trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Patologia Experimental com animais ectotermos preocuparam-se em padronizar condições satisfatórias para adaptação, mensuráveis pela ausência de excitação dos animais (embora se considerando a subjetividade desta avaliação), pela pronta aceitação da alimentação e pela não ocorrência de mortalidade. Torna-se importante ressaltar que esforços prévios por pesquisadores que desenvolveram e adequaram técnicas de manutenção de animais ectotermos (CATÃO-DIAS, 1987; CATÃO-DIAS, 1992; CATÃO-DIAS; SINHORINI, 1991; GARZILLO et al., 1992; GAVIOLLE, 1991; MAIORINO, 1999; MAIORINO et al., 1996; MATUSHIMA, 1988; MATUSHIMA, 1994; MIYAKI et al., 1993; RAMOS, 1992; RAMOS, 1997; RAMOS et al., 2001), bem como os avanços na tecnologia de biotérios (KRINKE, 2000; WOLFENSON; LLOYD, 2001), foram imprescindíveis para que linhas de pesquisa envolvendo o estudo da Patologia Comparada pudessem se desenvolver.

Durante todo o experimento não se observou óbitos de hamsters, tartarugas ou peixes, contudo, em relação aos girinos, ocorreu mortalidade de 30% até 14 dias, 70% até 28 dias e

100% até 42 dias pós-inoculação, não havendo, porém, nenhuma perda nos animais pertencentes ao grupo controle. Esta ocorrência foi constatada anteriormente quando girinos de rã touro-gigante foram inoculados com Mycobacterium marinum vivo, demonstrando expressiva mortalidade a partir do 21º dia pós-inoculação, envolvendo disseminação endógena do agente (MAIORINO, 1999). Relatos envolvendo elevados índices de mortalidade devido à infecções por micobactérias são frequentes na literatura, como verificado por Darzins já em 1952 numa epizootia entre gias (Leptodactilus pentadactylus) na região nordeste do Brasil, obtendo-se isolamento de Mycobacterium fortuitum. Michicao; La Placa necropsiaram 663 sapos do gênero *Pleuroderma* nos arredores da cidade de La Paz, Bolívia, observando lesões granulomatosas em 19,6% dos animais. Joiner; Abrams, 1970 relataram em rãs leopardo (Rana pipiens), utilizadas para diagnóstico de gravidez, surto de mortalidade devido a injeções de progesterona contaminadas por Mycobacterium sp. Em 1988, foi descrito um surto de micobacteriose por Barros et al. numa criação comercial de rãs touro-gigante (Rana catesbeiana) no estado do Rio de Janeiro, conseguindo reproduzir a doença experimentalmente. Constatação semelhante também foi relatada em adultos e girinos de rã touro-gigante por Magalhães et al., 1991, em criação comercial em Maricá, Rio de Janeiro. As descrições encontradas na literatura corroboram para explicar a alta mortalidade verificada neste experimento, indicando desse modo, o elevado grau de virulência de bactérias do gênero *Mycobacterium* para os anfibios.

Em 1994, Sinhorini et al., utilizaram o mesmo modelo experimental deste trabalho em hamsters, contudo sem observar mortalidade, resultado compatível com o verificado neste estudo, atribuindo-se que possivelmente, o tempo experimental de 42 dias pós-inoculação seja insuficiente para que ocorra a propagação de lesões, dado seu caráter crônico, a ponto de induzir o óbito.

Ramos, 1997, observou em tartarugas tracajá (*Podocnemys unifilis*) tendência à resolução de lesões granulomatosas quando provocadas pela inoculação de *Mycobacterium marinum* morto pelo calor, não sendo constatada mortalidade dos animais durante todo o período experimental, chegando ao 112° dia. Desta forma, todas as classes animais representadas neste estudo foram consideradas adaptadas às condições laboratoriais, excluindo-se possíveis variáveis relacionadas ao estresse que poderiam interferir na resposta inflamatória experimentalmente induzida.

II MIGRAÇÃO CELULAR E EVOLUÇÃO DO GRANULOMA

A presença de resposta inflamatória crônica em relação às micobactérias de diferentes espécies, inclusive induzida experimentalmente pelo uso de BCG, vem sendo classicamente estudadas em mamíferos (BALIAN, 1995; FERREIRA NETO, 1987; KREUGER et al., 1998; MARIANO, 1995; SINHORINI et al., 1994; PERRONE, 1996; PORTUGAL et al., 1990), mas também tem sido caracterizada em animais ectotermos (BARROS et al., 1984; BROWNSTEIN, 1984; BRUNO et al., 1998; CHINABUT et al., 1990; DIAMANT et al., 2000; DARZINS, 1952; DUNBAR; HERMAN, 1971; FOWLER, 1986; FRYE, 1981; FRYE, 1991;; GAUTHIER, 2003; MATUSHIMA, 1994; MICHICAO; LA PLACA, 1954; MONTALI, 1988; MORAES et al., 1996; MYIAKI et al., 1993; NONIDEZ; KAHN, 1934; NONIDEZ; KAHN, 1937; OLSON; WOODARD, 1974; PARISOT, 1958; QUESENBERRY et al., 1986; RAMAKRISHNAN; FALKOU, 1994; RAMOS, 1992; RAMOS et al., 2001; SCHRÖDER, 1985; SCHWABACHER, 1959; SHIVELI et al., 1981; SOUZA, 1993; WALLACH; BOEVER, 1983; WOLF; SMITH, 1999).

As primeiras descrições de granulomas em animais ectotermos datam de 1897 em peixes, com os relatos de Batallion e colaboradores (MATUSHIMA, 1994). Em anfibios,

Ruprecht em 1904 e Küster em 1905, encontraram lesões nodulares em órgãos, contudo estes pesquisadores não conseguiram caracterizar o agente, concluindo apenas que eram bastonetes álcool-ácido resistentes, aos quais deram o nome de "bacilo da tuberculose dos anfibios" (1913 BAERTHLEIN; TOYODA, apud SCHWABACHER, 1959, p. 58). Considerando-se os répteis, Sibley relatou, em 1889, um caso de tuberculose espontânea em serpente *Natrix natrix* (BROWNSTEIN, 1984). A partir dos levantamentos epidemiológicos e identificação dos agentes, começou-se a relacionar os achados de lesões granulomatosas com a presença de *Mycobacterium* sp (NIGRELLI; VOGEL, 1963). As descrições dos granulomas em animais ectotermos comparam a morfologia das lesões àquela observada em mamíferos propondo que estas eram muito semelhantes, inclusive quando analisada a lesão tuberculosa humana (ADAMS, 1976; MONTALI, 1988).

A reação granulomatosa observada nas tilápias-do-Nilo deste experimento revelou organização gradativa ao longo dos tempos experimentais, com evidente aumento no tamanho das lesões e formação expansiva de centro necrótico. Gauthier at al., 2003 propõe estágios de desenvolvimento para granulomas renais e hepáticos induzidos por inoculação intracelomática de *Mycobacterium marinum* em percas (*Morone saxatilis*); estes pesquisadores denominam "lesões pré-granulomatosas" àquelas caracterizadas por foco inflamatório de tamanho reduzido, pobremente organizado e composto por agrupamentos de macrófagos, linfócitos e granulócitos; esta descrição correspondeu à morfologia visualizada nas lesões de tilápias-do-Nilo deste experimento, com 14 dias pós-inoculação de BCG, e é parcialmente semelhante ao observado por Matushima, 1994, que inoculou BCG intramuscular, também em tilápias-do-Nilo, notando maior organização do padrão lesional, no mesmo tempo experimental. O segundo estágio de desenvolvimento, referido como "granuloma epitelióide" por Gauthier et al., 2003, foi correspondente à descrição dos granulomas observados em tilápias-do-Nilo aos

28 dias, exibindo região central necrótica, circundada por células epitelióides com citoplasma eosinofilico e, perifericamente, apresentando células com características linfocíticas; o mesmo foi relatado por Diamant et al., 2000 e Matushima, 1994. O terceiro estágio relatado pelos pesquisadores referidos acima, ao qual denominaram "granuloma de células alongadas", demonstrou morfologia muito próxima aos granulomas analisados nas tilápias, com 42 dias pós-inoculação, verificando-se a presença de células fusiformes circunscrevendo o centro necrótico e separando o componente epitelióide e linfocítico, além do desenvolvimento de lesões múltiplas. Esta caracterização também se apóia nos trabalhos de Dunbar; Herman, 1971 e Wolf; Smith, 1999. Bruno et al., 1998, discordam das descrições relatadas por não notar centro necrótico e fibroplasia em granulomas renais de salmões (Salmo salar) de criações comerciais, infectados por Mycobacterium chelonae, contudo, não há referências em seu trabalho com relação ao tempo de desenvolvimento das lesões. Quanto à presença de células gigantes multinucleadas, verificou-se no presente estudo ausência deste tipo celular participando da resposta inflamatória, fato este concordante com o visualizado por Bruno et al., 1998 e Gauthier et al., 2003 e diferiu dos achados de Matushima, 1994, que constatou a participação dessas em todos os tempos experimentais, assim como Dunbar; Herman, 1971.

Os granulomas gerados na musculatura da cauda de girinos de rã touro-gigante apresentaram padrão morfológico semelhante a descrições anteriores em girinos da mesma espécie inoculados com *Mycobacterium marinum* vivo, em tempos experimentais correlatos (MAIORINO, 1999), e em outras espécies de anfíbios (BARROS et al., 1988; MAGALHÃES et al., 1991; RAMAKRISHNAN e FALKOU, 1994; SOUZA, 1993; SHIVELI et al., 1981). Experimentos antigos, desenvolvidos por Nonidez e Kanh em 1934 e 1937, sugeriram estágios de desenvolvimento das lesões com diferente cinética celular nos anfíbios, mas revelando sempre uma tendência a aumentarem de tamanho. Estes pesquisadores propuseram

que os granulomas diferiram daqueles de mamíferos por não conter células gigantes e por apresentarem maior grau de hiperplasia fibroblástica, o que também é confirmado por Barros et al., 1984; Darzins, 1952; Michicao e La Placa, 1954; Moraes et al., 1996; Ramakrishnan; Falkou, 1994; Schwabacher, 1959 e Shiveli et al., 1981. Nosso experimento diferiu dos demais autores citados devido ao achado de células gigantes tipo corpo-estranho, embora raras, em granulomas com 28 dias de evolução. Encontro semelhante também é relatado por Joiner; Abrams, 1970; Maiorino, 1999 e pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP), 1995. Nossos resultados também são compatíveis àqueles verificados por Michicao e La Placa, 1954 e Barros et al., 1988, em relação à presença de linfócitos, cuja descrição refere-se à presença discreta destes tipos celulares, conforme observado aos 14 e 28 dias pósinoculação. Quanto à fibroplasia, os relatos de literatura vão de encontro ao verificado neste experimento, relacionando finas lâminas de fibrócitos envolvendo as lesões (BARROS, 1988; JOINER; ABRAMS, 1970; MAGALHÃES et al., 1991; MORAES et al., 1996).

Ao observar-se os resultados obtidos pela inoculação de BCG em tartarugas, constatou-se que as características morfológicas em muito assemelharam-se às descrições presentes na literatura. Ippen, 1964, inoculou micobactérias de origem bovina em jabutis (Geochelonis spp) verificando a formação de células gigantes multinucleadas dispostas em paliçadas ao redor de debris necróticos, chegando a acompanhar o desenvolvimento das lesões nos animais durante um ano. Essa característica morfológica coincide com nossos achados e com o verificado por Garzillo et al., 1992, através do implante subcutâneo de lamínulas em tartarugas tigres-d'água; por Miyaki, 1993, ao inocular Aeromonas hydrophila morta pelo calor também em tigres-d'água (Trachemys dorbignyi); e por Ramos, 1997, através da inoculação de Mycobacterium marinum vivo e morto em tartarugas tracajá (Podocnemys unifilis). Aos 14 dias pós-inoculação de M. marinum vivo, Ramos, 1997

descreve a presença de lesões granulomatosas com evidente infiltrado heterofílico, assim como observado neste experimento, no mesmo tempo experimental. Aos 28 dias, a mesma autora relata formações granulomatosas com células gigantes em paliçada ao redor de centros necróticos, característica esta que só foi observada aos 42 dias, pela inoculação de BCG em tartarugas da "orelha-vermelha". Esta variação pode-se relacionar ao agente indutor utilizado, uma vez que no mesmo experimento, Ramos, 1997, observou que os granulomas, quando induzidos pela inoculação de *M. marinum* vivo, foram mais exuberante do que com o mesmo agente morto pelo calor. O BCG é constituído por suspensão de *Mycobacterium bovis* atenuado, sendo esta característica provável justificativa para a variação morfológica observada neste experimento em relação aos tempos mais tardios.

Quanto aos hamsters, comparando-se os resultados obtidos por Sinhorini et al., 1994, verificou-se a mesma morfologia de lesões induzidas por BCG em coxim plantar de hamsters, que aos 14 dias caracterizaram-se por mantos de células epitelióides delimitados por células com características linfocíticas. Essas descrições também são suportadas pelos trabalhos de Arruda et al., 2002; Kreuger et al., 1998 e Wangoo et al., 2000. Kreuger et al, 1998 além de inocularem BCG no coxim de camundongos, também trataram um grupo de animais com L-NAME, que é um inibidor do metabolismo de NO, constatando desorganização do granuloma e ampliação da resposta inflamatória. Em nosso trabalho observou-se evolução do granuloma até o 42º dia estudado, com maior organização deste, assim como os dados referentes aos granulomas do grupo controle analisados pelos autores supracitados.

Ao analisarmos comparativamente o desenvolvimento das lesões granulomatosas em tilápias, girinos, tartarugas e hamsters, no mesmo tempo experimental, constatamos que, com 14 dias pós-inoculação, os granulomas estão bem estabelecidos nos girinos, tartarugas e hamsters, enquanto que nos peixes o infiltrado inflamatório apresenta-se multifocal sem a

morfologia típica da lesão; contudo, em todos os animais verificou-se ainda a presença de infiltrado granulocítico, nos focos lesionais.

Aos 28 dias foram visualizadas lesões bastante expressivas em todos os animais, evidenciando-se caráter proliferativo em hamsters, tartarugas e peixes, e nestes últimos notouse formação de centro necrótico; nos girinos não foi notada expansão da lesão, porém maior organização foi evidenciada e, em todos os animais, verificou-se substituição do infiltrado inflamatório por células mononucleares, com maior participação de células epitelióides e raras células polimorfonucleares.

Com 42 dias pós-inoculação tornou-se evidente a ampliação da lesão com maior expressão organizacional em peixes, tartarugas e hamsters. Esses resultados demonstraram tendência à cronificação do processo granulomatoso revelado pela ampliação do centro necrótico nos peixes e tartarugas, e, em todos, pela constatação de fibroplasia delimitando os granulomas.

As tentativas de classificar granulomas como a designação de granulomas imunológicos e não-imunológicos para mamíferos, proposta por Warren na década de 70, ou histiocíticos e heterofílicos no caso das tartarugas (MONTALI, 1988), vêm sendo negadas pelos trabalhos de Mariano, 1995, que demonstrou que os linfócitos T, apesar de atuarem na modulação do processo, não são fator essencial para a formação dos mesmos. Ramos, 1997, verificou que a dinâmica da formação de granulomas em tartarugas independe da colocação intra ou extracelular do agente injuriante, colocando-se em discussão, dessa forma, os dados antigos de literatura. Nesse sentido, os achados histopatológicos observados neste experimento, que condizem com as descrições presentes na literatura, demonstram que em cada espécie animal existem variações cinéticas e morfológicas características, mesmo quando utilizado o mesmo agente, sob as mesmas condições de manutenção e temperatura, e

possibilita sugerir que a compreensão do granuloma deva caminhar para a vertente da patobiologia molecular. A expressão dos mediadores químicos inflamatórios, como o óxido nítrico, em relação ao tipo e quantidade, poderá ser uma das chaves para elucidar a cinética do granuloma. Metodologias que atuem através da verificação da expressão do RNAm que codificam essas moléculas, poderão qualificá-las e quantificá-las em animais normais e nocauteados, permitindo relacionar sua presença à morfologia da lesão granulomatosa. Este trabalho objetivou e comprovou a participação filogenética precoce do óxido nítrico no processo inflamatório crônico granulomatoso, mediador que até a década de 80 era então desconhecido e cuja fisiopatologia ainda necessitará de novos experimentos para sua melhor compreensão.

III AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A ausência de trabalhos relacionados à participação do óxido nítrico em processos inflamatórios, particularmente em animais ectotérmicos, empobrece a discussão dos achados experimentais em relação à marcação imunoistoquímica. Sabe-se que os macrófagos presentes no granuloma possuem origem em monócitos presentes na circulação, que são atraídos quimiotaticamente para o foco inflamatório (SPECTOR, 1980) e constantemente renovados gerando o "turn over" das células na lesão (COTRAN et al., 1998). Estas células vão desenvolver no local, especificidade antigênica diferente de acordo com o estímulo, estando presentes no foco lesional diversas populações de macrófagos, que são capazes de perder e ganhar antígenos de superficie durante sua diferenciação patobiológica (MARIANO, 1995). A verificação da produção de óxido nítrico, neste trabalho, foi realizada de modo indireto, uma vez que a reação utiliza-se de anticorpos que reconhecem a iNOS, uma enzima que recebe este nome por ser induzível por diversas substâncias que se ligam a receptores específicos na

membrana das células inflamatórias, iniciando uma série de eventos levando à ativação dos processos de transcrição no núcleo da célula. Desse modo, é produzindo o RNA mensageiro da enzima que é, em seguida, sintetizada no citoplasma (CAMPBELL, 2000). Com isso, pode-se propor que a variação na produção de óxido nítrico, que nos girinos foi evidente somente no tempo mais tardio, correspondente a 28 dias pós-inoculação, seja dependente de fatores que induzam a atividade enzimática, cuja expressão somente nesse tempo experimental possa estar relacionada à presença dessas substâncias indutoras, ou ainda, ao desenvolvimento de receptores por algumas populações de macrófagos que vão passar a produzir o óxido nítrico. Nos demais animais - peixes, tartarugas e hamsters - já foi possível se observar células marcadas desde o primeiro período experimental, ou seja, com 14 dias pós-inoculação. Essas observações permitem sugerir que nesses animais as células inflamatórias desenvolvam mais precocemente receptores ou que os mediadores químicos sejam sintetizados anteriormente, dentre os quais se destacam as interleucinas, principalmente IL-1 como observado por Petricevich et al., 2000; Xu et al., 1999, e interferon, com destaque para o IFN-γ, demonstrado por Barros et al., 1998.

Outro aspecto constatado neste trabalho foi a diferença na intensidade da marcação imunoistoquímica, utilizando-se as mesmas concentrações de anticorpos nos diversos grupos. A intensidade da coloração mostra-se relativamente proporcional à quantidade de enzima, sendo que esta constatação foi mais expressiva em hamsters e girinos e menos intensa em peixes e tartarugas. Diante desses achados podem ser propostas duas hipóteses. A primeira relaciona-se à especificidade antigênica, uma vez que os anticorpos são produzidos em coelho, contra iNOS de origem humana. As pesquisas realizadas por Saeij et al., 2000, utilizando-se carpa comum (*Cyprinus carpio*) demonstraram, tendo como método a reação de PCR visando o seqüenciamento de iNOS e sua análise filogenética, após inoculação com LPS

e *Trypanoplasma borreli*, que houve 57% de correlação com a iNOS humana, conservando os mesmos locais de ligação de cofatores necessários para seu funcionamento. Laing et al., 1999, constataram após a estimulação *in vitro* de culturas celulares de macrófagos e *in vivo* pela inoculação de *Aeromonas salmonicida* em trutas arco-íris (*Onchorhynchus mykiss*), e após o seqüenciamento do RNAm por PCR, que ocorre 75% de homologia com os aminoácidos de iNOS de mamíferos. Essas descrições, desse modo, permitem sugerir reconhecimento parcial em peixes e tartarugas, justificando menor intensidade de marcação. A segunda hipótese correlaciona-se à resposta inflamatória em si, sugerindo que possa haver menor produção de óxido nítrico pelos macrófagos nesses animais, ou que haja menor estimulação através de outros mediadores químicos, ou ainda, que haja menor expressão de receptores de membrana, nos tempos estudados.

A marcação imunoistoquímica comparada observada neste trabalho pôde contribuir com mais alguns dados para a compreensão da formação do granuloma, uma vez que macrófagos em todas as espécies estudadas foram positivos para iNOS revelando que a filogênese de processos enzimáticos para a síntese de mediadores químicos inflamatórios vem sendo mantida na escala evolutiva. Estas moléculas mantidas, por sua vez, vão atuar atraindo células inflamatórias e modulando sua diferenciação e, desse modo, produzindo características morfológicas lesionais semelhantes quando observadas as diferentes espécies, fato que se justifica nas conclusões de Kreuger, 1998, que demonstrou desarranjo organizacional do granuloma na ausência de óxido nítrico. Ressalta-se o óxido nítrico como apenas uma das muitas moléculas diretamente envolvidas no processo inflamatório crônico, e o presente trabalho permite inferir, sob o ângulo filogenético, que este mediador atua na modulação do granuloma, participando deste mecanismo extremamente antigo que busca equilibrar a relação parasita-hospedeiro.

CONCLUSÕES

- O óxido nítrico participa da resposta inflamatória granulomatosa induzida pela inoculação de BCG em peixes, anfibios, répteis e mamíferos, com variações específicas em relação à morfologia, evolução da lesão e intensidade de marcação.
- A utilização de imunoistoquímica com anticorpos anti-iNOS humana, produzidos em coelhos, mostrou-se método eficiente para evidenciar a produção de óxido nítrico em estudos filogenéticos.
- A modulação da resposta granulomatosa em peixes, anfibios, répteis e mamíferos possui participação do óxido nítrico de maneira similar entre as diferentes espécies.
- Pesquisas futuras deverão qualificar e quantificar mediadores químicos envolvidos na regulação da participação do óxido nítrico para melhor compreender sua fisiopatologia na modulação do granuloma inflamatório.

REFERÊNCIAS*

ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. **American Journal of Pathology**, v. 84, n. 1, p. 164-192, 1976.

AFIP – ARMED FORCES INTITUTE OF PATHOLOGY. **Wednesday Slide Conference** – n.29. Case I – 93-137 (AFIP 2478047), 1995. p. 1-3.

AGUIAR-PASSETI, T.; POSTOL, E.; SORG, C.; MARIANO, M. Epithelioid cells from foreign body granuloma selectively express the calcium-binding protein MRP-14, a novel down regulatory molecule of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. ____, p. 852-858, 1997.

AHN, B.; HAN, B. S.; KIM, D. J.; OHSHIMA, H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 7, p. 1337-1344, 1999.

ALLAERTS, W.; KOOPMAN, W. J. H.; VERLAAN, B. P. J.; BUZZI, M.; STEERENBERG, P. A. Endogenous production of nitric oxide and effects of nitric oxide and superoxide on melanotrope functioning in the pituitary pars intermédia of Xenopus laevis. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 15-28, 2000.

ALLAERTS, W.; UBINK, R.; VENTE, J.; TUINHOF, R.; JENKS, B. G.; ROUBOS, E. W. Nitric oxide syntase and background adaptation in *Xenopus laevis*. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 14, n. , p, 21-31, 1997.

ARRUDA, M. S. P.; NOGUEIRA, M. E. S.; BORDON, A. P.; DE ARRUDA, M. S. P. Histological evaluation of the lesion induced by inoculation of *Leishmania mexicana* in the cheek pouch of the hamster. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 293-297, 2002

BALIAN, S. C. Estudo das linfadenites tuberculóides em suínos abatidos em matadouro da região da grande São Paulo, no período de 1993 a 1994. Aspectos macroscópicos, histopatológicos e pesquisa de micobactérias. 1995. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

BARROS, G. C.; LANGENEGGER, C. H.; LANGENEGGER, J.; PEIXOTO, P. V. Surto de micobacteriose em criação de rãs (*Rana catesbeiana*) causado por *Mycobacterium marinum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 3/4, p. 75-80, 1988.

BARROS, S. F.; FRIEDLANSKAIA, I.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. ____, p. 339-346, 1998.

^{*} Referências e citações no texto de acordo com as diretrizes do serviço de biblioteca e documentação da FMVZ.

BARROSO, J. B.; CARRERAS, A.; ESTEBAN, F. J.; PEINADO, E. M. L; VALDERRAMA, R.; JIMÉNEZ, A.; RODRIGO, J.; LUPIÁÑEZ, J. A. Molecular and kinetic characterization and cell type location of inducible nitric oxide synthase in fish. **American Journal of Physiology**, v. 279, n. 2, p. R 650-R 656, 2000.

BAERTHLEIN, K; TOYODA, A., 1913 apud SCHWABACHER, H. 1959, p. 57.

BISWAS, S. K..; SODHI, A.; PAUL, S. Regulation of nitric oxide production by murine peritoneal macrophages treated *in vitro* with chemokine monocyte chemoattractant protein 1. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 566-579, 2001.

BODEGAS, M. E.; VILLARO, A. C.; MONTUENGA, L. M.; MONCADA, S.; RIVEROS-MORENO, V.; SESMA, P. Neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in the respiratory tract of the frog, Rana temporaria. **Histochemical Journal**, v. 27, n. ____, p. 812-818, 1995.

BONAMIN, L. V.; PAULINO, C. A. Imunofarmacologia. In: SPINOSA, H. S.; GÓRNIAK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 510-522.

BROWNSTEIN, D. G. Mycobacteriosis. In: HOFF, G. L.; FRYE, F. L.; JACOBSON, E. R. **Diseases of Amphibians and Reptiles**. New York: Plenum Press, 1984. p. 129-142.

BRUNO, D. W.; GRIFFITHS, J.; MITCHELL, C. G.; WOOD, B. P.; FLETCHER, Z. J.; DROBNIEWSKI, F. A.; HASTINGS, T. S. Pathology attributed to *Mycobacterium chelonae* infection among farmed and laboratory-infected atlantic salmon *Salmo salar*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 33, n. ____, p. 101-109, 1998.

CAMPBELL, M.K. O metabolismo em perspectiva. In: _____. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 652-684.

CAMPOS-PEREZ, J. J.; WARD, M.; GRABOWSKI, P. S.; ELLIS, A. E.; SECOMBES, C. J. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. **Immunology**, v. 99, n. ____, p.153-161, 2000.

CATÃO-DIAS, J.L.C. Influência da temperatura ambiental sobre a resposta celular inflamatória e a evolução do perfil leuco-trombocitário no sangue periférico de rã tourogigante (*Rana catesbeiana*, SHAW – 1802). 1992. 109 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

CATÃO-DIAS, J.L.C. Influência da temperatura sobre a resposta celular inflamatória induzida experimentalmente por corpo estranho na cauda de girinos de rã touro-gigante (*Rana catesbeiana*). 1987. 67 f. Dissertação (Mestrado e, Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987.

- CATÃO-DIAS, J.L.C.; SINHORINI, I.L. Influence of high environmental temperature on inflammation and repair induced by a foreign body in bullfrog (*Rana catesbeiana*) tadpoles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 24, n. ____, p. 583-586, 1991.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. Basic concepts of metabolism. In: _____. **Biochemstry**. 2. ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994. p. 75-86.
- CHAMULITRAT, W.; JORDAN, S. J.; MASON, R. P.; LITTON A. L.; WILSON, J. G.; WOOD, E. R.; WOLBERG, G.; MOLINA Y VEDIA, L. Targets of nitric oxide in a mouse model of liver inflammation by *Corynebacterium parvum*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 1, p. 30-37, 1995.
- CHAN, M. M. Y.; FONG, D.; HO, C. T.; HUANG, H. I. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. , p. 1281-1286, 1997.
- CHINABUT, S.; LIMSUWAN, C.; CHANRATCHAKOOL, P. Mycobacteriosis in the snakehead, *Channa striatus* (Fowler). **Journal of Fish Diseases**, v. 13, n. ____, p. 531-535, 1990.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Inflammation and repair. In: _____. **Robbins pathologic basis of disease**. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 51-92.
- COX, R. L.; MARIANO, T.; HECK, D. E.; LASKIN, J. D.; STEGEMAN, J. J. Nitric oxide synthase sequences in the marine fish Stenotomus chrysops and the sea urchin Arbacia punctulata, and phylogenetic analysis of nitric oxide synthase calmodulin-binding domains. **Comparative Biochemstry and Physiology** Part B, v. 130, p. 479-491, 2001.
- DARZINS, E. The epizootic of tuberculosis among the gias in Bahia. **Acta Tuberculosea Scandinavica**, v.26, n. ____, p.170-174, 1952.
- DIAMANT, A.; BANET, A.; UCKO, M.; COLORNI, A.; KNIBB, W.; KVITT, H. Mycobacteriosis in wild rabbitfish *Siganus rivulatus* associated with cage farming in the Gulf of Eilat, Red Sea. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 39, n. , p. 211-219, 2000.
- DUNBAR, C. E.; HERMAN, R. L. Visceral granuloma in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Journal of Nutrition**, v. 101, n. ____, p. 1445-1452, 1971.
- FERREIRA NETO, J. S. A lesão tuberculóide macroscópica como critério diagnóstico da infecção micobacteriana em suínos abatidos em matadouro. 1987. 44 f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987
- FISH, J. E. Asthma heterogeneity. In: AMERICAN THORACIC SOCIETY INTERNATIONAL CONFERENCE OF AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 1999. **Proceedings...** Disponível em <: //www.medscape.com/medscape/cno/1999/ALA_ATS/Story.cfm/ story_id=539> Acesso em:24 mai. 2000.

- FLETCHER, D. S.; WIDMER, W. R.; LUELL, S.; CHRISTEN, A.; OREVILLO, C.; SHAH, S; VISCO, D. Therapeutic administration of a selective inhibitor of nitric oxide synthase does not ameliorate the chronic inflammation and tissue damage associated with adjuvant-induced arthritis in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 284, n. 2, p. 714-721, 1998.
- FOWLER, M. E. **Zoo and Wildlife Medicine.** Philadephia: W. B. Saunders, 1986. 1028p.
- FRYE, F. L. Reptile Care. Neptune City: T. F. H. Publications, 1991. 421p.
- FRYE, F. L. **Biomedical and Surgical Aspects of Captive Reptile Husbandry**. Edwardsville: Veterinary Medicine Publishing, 1981. 456p.
- GAGIOTI, S.; SCAVONE, C.; BEVILACQUA, E. Participation of the mouse implanting trophoblast in nitric oxide production during pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. ____, p. 260-268, 2000.
- GARRETT, R. H.; GRISHAM, C. M. The reception and transmission of extracellular information.. In: _____. **Biochemstry.** Orlando: Saunders College Publishing, 1999. p.S-0 S-66.
- GARZILLO, J. F.; CATÃO-DIAS, J. L. C.; RAMOS, M. C. C.; MALUCELLI, B. E. Avaliação da cinética celular inflamatória induzida por implante subcutâneo de lamínulas de vidro em tartarugas tigre d'água (*Trachemys dorbignyi*). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7., 1992, Caxambu, **Anais...** Caxambu: FESBE, 1992. p. ?
- GAUTHIER, D. T.; RHODES, M. W.; VOGELBEIN, W. K.; KATOR, H.; OTTINGER, C. A. Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, n. ____, p. 105-117, 2003.
- GAVIOLLE, M. C. Aspectos morfológicos da interação regeneração inflamação em Rana catesbeiana (SHAW, 1802): estudo experimental. 1991. 124 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.
- GOBETTI, A.; ZERANI, M. Nitric oxide mediates gonadotrophin-releasing hormone effects on frog pituitary. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, n. ____, p. 407-416, 1998.
- GOBETTI, A.; ZERANI, M. In vitro nitric oxide effects on basal and gonadotropin-releasing hormone-induced gonadotropin secretion by pituitary gland of male crested newt (*Triturus carnifex*) during the annual reproductive cicle. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. ____, p. 1217-1223, 1999.
- GONG, Y.; SYMMANS, W. F.; KRISHNAMURTHY, S.; PATEL, S.; SNEIGE, N. Optimal fixation conditions for immunocytochemical analysis of estrogen receptor in cytologic specimens of breast carcinoma. **Cancer**, v. 102, n. 1, p. 34-40, 2004.

- GOSNER, K.. A simplifield table for staging anuram embryos and larvae with notes on identification. **Herpetologica**, v. 16, n. , p. 183-190, 1960.
- GUZZO, M. L.; FARSKI, S. H. P.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E.; SILVA, M. A. G.; MELLO, S. B. V. Role of kinines and nitric oxide on the rat arthritis induced by *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 38, n. ____, p. 1535-1546, 2000.
- HALUZÍK, M. Nitric oxide its effects and significance in the human body. **Cas Lek Cesk**, v. 137, n. 9, p. 259-263, 1998. Abstract.
- IPPEN, R. Vergleichende pathologische untersuchungen über die spontane uns experimentelle tuberkulose der kaltblüter. 1964. 90 f. Tese (Doutorado) Abhandlungen der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Berlin, 1964.
- JOINER, G. N.; ABRAMS, G. D. Tuberculosis in the leopard frog (*Rana pipiens*). **The Journal of Infectious Disease**, v. 122, n. 1/2, p. 96-99, 1970.
- KASHIWAGI, A.; HANADA, H.; YABUKI, M.; KANNO, T.; ISHISAKA, R.; SASAKI, J.; INOUE, M.; UTSUMI, K. Thyroxine enhancement and the role of reactive oxygen species in tadpole tail apoptosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 1001-1009, 1999.
- KEILHOFF, G.; REISER, M.; STANARIUS, A.; AOKI, E.; WOLF, G. Citrulline immunohistochemistry for demonstration of NOS activity in vivo and in vitro. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 343-353, 2000.
- KREUGER, M. R. O. **Influência do óxido nítrico na cinética e evolução do granuloma experimental**. 1997. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997.
- KREUGER, M. R. O.; TAMES, D. R.; MARIANO, M. Expression of NO-synthase in cells of foreign-body and BCG-induced granulomata in mice: influence of L-NAME on the evolution of the lesion. **Immunology**, v. 95, n. ____, p. 278-282, 1998.
- KRINKE, G. The laboratory rat. London: Academoc Press, 2000. 756p.
- LAING, K. J.; GRABOWSKI, P. S.; BELOSEVIC, M.; SECOMBES, C. J. A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, n. , p. 374-379, 1996.
- LAING, K. J.; HARDIE, L. J.; AARTSEN, W.; GRABOWSKI, P. S.; SECOMBES, C. J. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 23, n. ____, p. 71-85, 1999.
- LAZARUS, S. C. Just say NO: nitric oxide and its role in allergic disease. *In*: ANNUAL MEETING OF AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, ASTHMA AND IMMUNOLOGY, 56., 2000, San Diego. **Proceedings...** Disponível em: < http://www.medscape.com/medscape/cno/ 2000/AAAAI/Story.cfm/story_id=1058 >. Acesso em: 24 mai. 2001.

- LI, Y,; NGUYEN, T. D.; STECHSCHULTE, A. C.; STECHSCHULTE, D. J.; DILEEPAN, K. N. Effect of mast cell granules on the gene expression of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-α in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 7, n. ____, p. 355-361, 1998.
- LI, Z. S.; FURNESS, J. B.; YOUNG, H. M.; CAMPBELL, G. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase enzyme activity in neurons of the gastrointestinal tract of the toad, Bufo marinus. **Archieves of Histology and Cytology**, v. 55, n. 4.; p. 333-350, 1992.
- MAGALHÃES, H.; CARNEIRO, G. M.; PIRES, A. R.; MEDEIROS, M. I. M.; GONÇALVES, W. M.; SILVA, M. C.; FONSECA, L. S.; SANTIAGO, S. S. F.; MELLO, S. C. R. P. Micobacteriose em rãs touro (Rana catesbeiana SHAW, 1802). **Revista de Microbiologia**, v. 22, n. 3, p. 204, 1991. Suplemento 1. Resumo.
- MAIORINO, F. C. Avaliação do processo inflamatório induzido experimentalmente pela inoculação de *Aeromonas hidrophila* e *Mycobacterium marinum* em girinos de rã tourogigante (*Rana Catesbeiana*, SHAW 1802). 1999. 186 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- MAIORINO, F. C.; RAMOS, M. C. C.; DAGLI, M. L. Z.; FIORIO, W. A. B.; SINHORINI, I. L. Avaliação da resposta inflamatória induzida pelo implante subcutâneo de lamínulas de vidro em tecido subcutâneo de jacarés-do-pantanal (*Caiman crocodilus yacare*). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 11. 1996, Caxambu. **Anais...** Caxambu: FESBE, 1996. p. 395.
- MARIANO, M. Invited review. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical do Estado de São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 1-16, 1995.
- MATUSHIMA, E. R. Cinética da reação inflamatória induzida pela injeção de carragenina na bexiga natatória de <u>Oreochromis niloticus</u> (Tilápia-do-Nilo). 1988. 53 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1988.
- MATUSHIMA, E.R. Avaliação do processo inflamatório crônico granulomatoso induzido experimentalmente através da inoculação de BCG em peixes da espécie Oreochromis niloticus Tilápias-do-Nilo. 1994. 110 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- METCHNIKOFF, E. Lectures on the Comparative Pathology of Inflammation. New York: Dover Publications, 1968. 223 p.
- MICHICAO, N.; LA PLACA, E. Lepra-like granulomas in frogs. **Laboratory Investigation**, v. 3, n. ____, p. 219-227, 1954.

- MILES, A. M.; OWENS, M. W.; MILLIGAN, S.; JOHNSON, G. G.; FIELDS, J. Z.; ING, T. S.; KOTTAPALLI, V.; KESHAVARZIAN, A.; GRISHAM, M. B. Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, n. , p. 616-622, 1995.
- MOLERO, M.; HERNANDEZ, I. M.; LOBO, P.; C ARDENAS, P.; ROMERO, R.; CHACIN, J. Modulation by nitric oxide of gastric acid secretion in toads. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 164, n. , p. 229-236, 1998.
- MONTALI, R. J. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). **Journal of Comparative Pathology**, v. 99, n. , p. 1-26, 1988.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Patologia: processos gerais. 4. ed. São Paulo : Atheneu, 1999. 320 p.
- MORAES, J. R. E.; TORRES, H. A.; MARTINS, M. L.; SOUZA, V. N.; MORAES, F. R. Tuberculose em *Rana catesbeiana* SHAW, 1802 em ranários comerciais diagnosticada pelo centro de aquicultura da UNESP. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE ORGANISMOS AQUÁTICOS, 4., 1996, Pirassununga. **Resumos...** p. 28.
- MUÑOZ, M.; MERÍN, O; GONZALEZ, A. Localization of NADPH diaphorase/ nitric oxide sythase and choline acetyltransferase in the spinal cord of the frog, Rana perezi. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 419, n. , p. 451-470, 2000.
- MYIAKI, C. M.; RAMOS, M. C. C.; MATUSHIMA, E. R.; MALUCELLI, B. E. Avaliação da cinética celular inflamatória induzida experimentalmente por *Aeromonas hydrophila* morta pelo calor em tartarugas tigre d'água (*Trachemys dorbignyi*). In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7., 1993, Caxambu. **Anais...** Caxambu: FESBE, 1993. p.25.
- NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. **Cell**, v. 78, n. ___, p. 915-918, 1994.
- NIGRELLI, R. F.; VOGEL, H. Spontaneous tuberculosis in fishes and in other cold-blooded vertebrates with special reference to Mycobacterium fortuitum Cruz from fish and human lesions. **Zoologica**, v. 48, n. ____, p. 131-143, 1963.
- NIU, X. L; XIA, HOSHIAI, K.; TANAKA, K.; SAWAMURA, S.; NAKAZAWA, H. Inducible nitric oxide synthase knockout mouse macrophages disclose prooxidant effect of interferon-γ on low-density lipoprotein oxidation. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 363-371, 2000.
- NONIDEZ, J. F.; KAHN, M. C. Experimental tuberculosis infection in the tadpole and the mechanism of its sprad. **American Review of Tuberculosis**, v. 36, n. , p. 191-211, 1937.
- NONIDEZ, J. F.; KAHN, M. C. Tuberculosis induced in the tadpole by feeding. **Proceeding of the Society Experimental Biology and Medicine**, v.36, n. ____, p.783-787, 1934.

- OKITA, R. T.; MASTERS, B. S. S. Biotransformations: the cytochrome P450. In: DELVIN, T. M. **Textbook of biochemstry with clinical correlations**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 1997. ? ? p.
- OLSON, G. A.; WOODARD, J. C. Miliary tuberculosis in a reticulated Python, **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 164, n. 7, p. 733-735, 1974.
- PARISOT, T.J. Tuberculosis in fish: a review of the literature with a description of the disease in salmonid fish. **Bacteriological Reviews**, v. 22, p. 240-245, 1958.
- PERRRONE, E. A. Estudo histológico, morfométrico e imuno-histoquímico do granuloma induzido experimentalmente pelo *M. bovis* e submetido ao tratamento pela isoniazida em hamster (*Mesocricetus auratus*). 1996. 73 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- PETRICEVICH, V. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; TAMBOURGI, D. V.; GUTIÉRREZ, J. M. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 36, n. ____, p. 1253-1266, 2000.
- PLACIDO, R.; MANCINO, G.; AMENDOLA, A.; MARIANI, F.; VENDETTI, S.; PIACENTINI, M.; SANDUZZI, A.; BOCCHINO, M. L.; ZEMBALA, M.; COLIZZI, V. Apoptosis of human monocytes/macrophages in Mycobacterium tuberculosis infection. **Journal of Pathology**, v. 181, n. 1, p. 31-38, 1997. Resumo.
- PORTUGAL, M. A. S. C.; CALILI, E. M. B.; FARINHA, F. B. N.; GUERRA, J. L. Surto de tuberculose em criação de chinchilas (*Chinchilla lanigera*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 57, n. 1/2, p. 57-61, 1990.
- PRÓNAI, L.; SZALECZKY, E.; FEHÉR, J. Nitric oxide. Basic research and possible clinical use (see comments). **Orv Hetil**, v. 137, n. 31, p. 1699-1704, 1996. Abstract.
- QUESENBERRY, K. E.; JACOBSON, E. R.; ALLEN, J. L.; COOLEY, A. J. Ulcerative stomatitis and subcutaneous granulomas caused by *Mycobacterium chelonei* in a *Boa constrictor*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 9, p. 733-735, 1986.
- RAMAKRISHNAN, L.; FALKOU, S. *Mycobacterium marinum* persists in cultured mammalian cells in a temperature-restricted fashion. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 8, p.3222-3229, 1994.
- RAMOS, M. C. C. Avaliações qualitativas, quantitativas e ultra-estruturais da resposta inflamatória induzida experimentalmente por corpo estranho em tartarugas tigre d'água (*Trachemys dorbignyi*, Duméril & Bibron, 1835). 1992. 50 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

- RAMOS, M. C. C. Avaliação de aspectos morfológicos, histoquímicos, imunohistoquímicos e ultra-estruturais do processo inflamatório crônico, induzido experimentalmente pela inoculação de *Mycobacterium marinum* vivo e morto pelo calor, em tartarugas tracajá *Podecnemis unifilis* TROSCHEL, 1848. 1997. 129 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.
- RAMOS, M. C. C.; CATÃO-DIAS, J. L.; GAVIOLLE, M. C.; SINHORINI, I. L. Evaluation of the inflammatory response experimmentaly induced by a foreign body in fresh water turtles (*Trachemys dorbignyi*). **Revista Española Herpetologica**, v. 15, n. ____, p. 77-83, 2001.
- RICA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M. C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Reseach**, v. 89, n. 3, p. 163-169, 2003.
- SAEJI, J. P. J.; STET, R. J. M.; GROENEVELD, A.; KEMENADE, L. B. M. V. K.; Van MUISWINKEL, W. B.; WIEGERTJES, G. F. Molecular and functional characterization of a fish inducible-type nitric oxide synthase. **Immunogenetics**, v. 51, n. ____, p. 39-46, 2000.
- SCHMIDT, H. H. H. W.; WALTER, U. NO at work. Cell, v. 78, n. , p. 919-925, 1994.
- SCHRÖDER, H. D. Bakterielle Erkankungen. In: IPPEN, R.; SCHRÖDER, H. D.; ELZE, K. **Handbuch der Zootierkrankheiten**. Berlin: Akademie-Verlag, 1985. p.432.
- SCHWABACHER, H. A strain of *Mycobacterium* isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli accurring in man. **Journal of Hygiene**, v. 57, n. , p. 57-67, 1959.
- SETHI, S.; SHARMA, P.; DIKSHIT, M. Nitric oxide- and oxigen derived free radical gemeration from control and lipipolysaccharide-treated rat polymorphonuclear leukocyte **Nitric Oxide**, v. 5, n. 5, p. 482-493, 2001.
- SHIN, D. H.; LIM, H. S.; CHO, S. K.; LEE, H. Y.; LEE, H. W.; LEE, K. H.; CHUNG, Y. H.; CHO, S. S.; CHA, C. I.; HWANG, D. H. Immunocytochemical localization of neuronal and inducible nitric oxide synthase in the retina of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Neuroscience Letters**, v. 292, n. ____, p. 220-222, 2000.
- SHIVELY, J. N.; GLENNSONGER, J.; PRCHAL, S.; KEASEY III, M. S.; THOEN, C.O. *Mycobacterium marinum* infection in bufonidae. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 1, p. 3-7, 1981.
- SILVA, J. R. M. C.; STAINES, N. A.; HERNANDEZ-BELAZQUEZ, F. J.; PORTO-NETO, L. R.; BORGES, J. C. S. Phagocytosis and giant cell formation at 0°C by macrophages (MØ) of *Notothenia coriiceps*. **Journal of Fish Biology**, v. 60, n. , p. 466-478, 2002.
- SINHORINI, I. L.; MERUSSE, J. L. B.; MARIANO, M. Role of lymphatic drainage on the development of Calmette-Guérin Bacillus induced granulomas in the hamster. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 103, n. ____, p. 166-174, 1994.

- SOUZA, C. W. O. Ocorrência de Mycobacterium sp em exemplares de Rana catesbeiana, SHAW, 1802, de alguns ranários comerciais do estado de São Paulo, Brasil. 1993. 79 f. Dissertação (Mestrado) Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1993.
- SPECTOR, W. G. An introduction to general pathology. 2. ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980. p. 301.
- STRYER, L. Biossíntese de aminoácidos e do hemo. In: _____. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p. 679-703.
- TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflamatory mechanisms in the vascular wall. Circulation Research, v. 38, n. ____, p. 877-887, 2001.
- THOMSON, R. G. Inflamação e reparo. In: _____. **Patologia geral veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983. p. 144-250.
- WALLACH, J. D.; BOEVER, W. **Diseases of Exotic Animals**. Philadephia: W. B. Saunders, 1983. 728p.
- WANGOO, A.; BROWN, I. N.; MARSHALL, B. G.; COOK, H. T.; YOUNG, D. B.; SHAW, R. J. Bacille Calmette-Guérin (BCG)-associated inflammation and fibrosis: modulation by recombinant BCG expressing interferon-gama (IFN-γ). **Clinical Experimmental Immunology**, v. 119, n. ____, p. 92-98, 2000.
- WOLF, J. C.; SMITH, S. A. Comparative severity of experimentally induced mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis* and hybrid tilapia *Oreochromis* spp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 38, n. ____, p. 191-200, 1999.
- WOLFENSOHN, S.; LLOYD, M. Handbook of laboratory animal management and welfare. 2. ed. Oxford: Blackwell Science, 2001. 334p.
- XU, R.; MORALES, J. A.; MUNIYAPPA, R.; SKAFAR, D. F.; RAM, J. L.; SOWERS, J. R. Interleukin-1beta-induced nitric oxide production in rat aortic endothelial cells: inhibition by estradiol in normal and high glucose cultures. **Life Sciences**, v. 64, n. 26, p. 2451-2462, 1999.

ANEXO 1.

VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E UMIDADE NO PERÍODO EXPERIMENTAL DE 22.10.2002 À 05.12.2002

		T℃ ÁGUA	T℃ AR MÁXIMA	T℃ AR MÍNIMA	UMIDADE (%)
DIAS	HORA				
23/10	17:35	21	29	22	61
24/10	14:15	22	26	22	67
25/10	13:00	25	28	23	56
26/10	11:34	24	27	25	64
27/10	12:00	24	28	25	60
28/10	13:10	25	29	25	54
29/10	12:17	25	28	25	52
30/10	12:07	25	27	25	62
31/10	12:16	24	27	24	64
01/11	11:33	23	25	23	66
02/11	13:20	23	26	23	62
03/11	14:15	24	26	23	46
04/11	13:15	24	27	24	54
05/11	13:20	24	27	24	62
06/11	13:07	20	25	22	54
07/11	13:56	20	24	20	60
08/11	13:50	20	24	20	52
09/11	12:39	23	25	22	54
10/11	17:15	24	27	24	54
11/11	13:45	24	27	25	58
15/11	10:30	24	27	24	62
13/11	13:15	22	26	23	68
14/11	13:50	23	25	22	64
15/11	13:50	23	26	23	64
16/11	11:45	24	26	24	62
17/11	15:00	24	27	24	58
18/11	14:20	26	29	25	53
19/11	11:30	26	30	26	62
20/11	14:50	25	31	26	60
21/11	14:00	28	32	28	48
22/11	14:00	25	31	26	61
23/11	15:00	25	28	26	68
24/11	13:30	24	29	25	63
25/11	14:30	26	29	27	58
26/11	14:00	24	29	26	68
27/11	12:35	25	27	24	66
28/11	12:00	26	29	26	58
29/11	12:00	26	29	26	60
30/11	12:00	26	29	26	62
01/12	12:00	26	29	26	58
02/12	12:45	26	30	26	64
03/12	10:50	25	28	26	70