

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA EM *Piaractus  
mesopotamicus* E *Oreochromis niloticus* POR CORPO  
ESTRANHO E BACILO DE CALMETTE - GUÉRIN**

**Wilson Gómez Manrique**

Médico Veterinário e Zootecnista

2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA  
INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA EM *Piaractus  
mesopotamicus* E *Oreochromis niloticus* POR CORPO  
ESTRANHO E BACILO DE CALMETTE - GUÉRIN**

**MSc. Wilson Gómez Manrique**

**Orientador Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes**

**Coorientadora: Dra. Maria Isabel Quiroga Berdeal**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Patologia Veterinária).

M285e Gómez Manrique, Wilson  
Estudo comparativo da resposta inflamatória crônica induzida em *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus* por corpo estranho e bacilo de Calmette-Guérin. / Wilson Gómez Manrique. – – Jaboticabal, 2012  
xxi, 93 f. ; 28 cm

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Flávio Ruas de Moraes  
Banca examinadora: Eduardo Juan Gimeno, Rogério Salvador, Laura Satiko Okada Nakaghi, Marco Antonio de Andrade Belo.  
Bibliografia

1. Centros de melanomacrófagos. 2. granuloma. 3. Imuno-histoquímica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:021:639.31

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

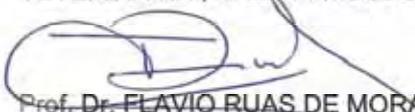
**TÍTULO:** ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CRÔNICA INDUZIDA EM *Piaractus mesopotamicus* E *Oreochromis niloticus* POR CORPO ESTRANHO E BACILO DE CALMETTE - GUÉRIN

**AUTOR:** WILSON GOMEZ MANRIQUE

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARIA ISABEL QUIROGA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FLAVIO RUAS DE MORAES

Departamento de Patologia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



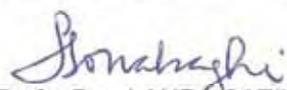
Prof. Dr. EDUARDO JUAN GIMENO

Universidad Nacional de La Plata / Buenos Aires / Argentina



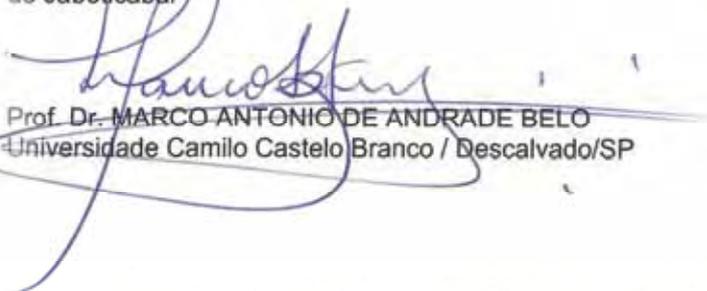
Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR

Universidade Estadual do Norte do Paraná / Bandeirantes/PR



Profa. Dra. LAURA SATIKO OKADA NAKAGHI

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO DE ANDRADE BELO

Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP

Data da realização: 14 de dezembro de 2012.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**WILSON GÓMEZ MANIRIQUE** – Nascido em 10 de fevereiro de 1978 em Hobo – Huila, Colômbia, filho de Isidro Gómez e Ligia Manrique de Gómez. Em 1998, ingressou na “Facultad de Ciencias Agropecuárias y Recursos Naturales de la Universidad de los Llanos – Colombia”, no curso de Medicina Veterinária e Zootecnia. No ano 2006, estagiou no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto. Graduou-se como Médico Veterinário Zootecnista em dezembro de 2006. Em 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da Unesp, área de concentração Ecotoxicologia e obteve o título de Mestre em fevereiro de 2009, sob a orientação do Prof. Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto. Em março de 2009, iniciou o Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Flávio Ruas de Moraes e co-orientação da Dra. Prof<sup>a</sup>. Maria Isabel Quiroga Berdeal da Universidad Santiago de Compostela – Espanha; bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) processo 2009/17640-7. Realizou estágio de aperfeiçoamento no Departamento de Anatomia Patológica Veterinária da Universidad Santiago de Compostela - Espanha no período de 01 fevereiro a 31 de abril de 2010. Realizou estágio de aperfeiçoamento no Departamento de Patologia Veterinária da Universidad Nacional de La Plata, Argentina, no período de 13 a 17 de fevereiro de 2012 em técnicas de lectino e imuno-histoquímica aplicada em Medicina Veterinária.

Si quieres ser sabio, aprende a interrogar razonablemente, a escuchar con atención, a responder serenamente y a callar cuando no tengas nada que decir.

**Johann Kaspar Lavater**

**A minha esposa Mayra Araguaia pelo amor, compreensão e ajuda incondicional**

**Aos meus filhos Whernner Dubbeth e Olivier Nolan por serem inspiração da minha vida**

**Aos meus irmãos, Robinson, William, Wilmer e Yeyssom e todos meus sobrinhos e sobrinhas**

**Aos meus pais, Isidro Gómez e Ligia Manrique de Gómez, pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim**

**A toda minha família,  
colombiana e brasileira**

**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

A DEUS por me permitir continuar conquistando logros;

Ao professor orientador Dr. Flávio Ruas de Moraes, por motivar este trabalho, pela orientação, amizade e principalmente pela grande confiança depositada;

À professora Dra. Maria Isabel Quiroga Berdeal da Universidad Santiago de Compostela – Espanha pelo acolhimento, ensinamento, pelas sugestões e orientação nas análises de imuno-histoquímica;

Ao professor Dr. Eduardo Juan Gimeno da Universidad Nacional de La Plata (Argentina), pelas sugestões nas análises de lectino-histoquímica;

Aos colegas de pós-graduação do Laboratório de Ictiopatologia, Marcello Pardi de Castro, Fernando Moraes Machado Brito, Gustavo da Silva Claudiano, Thalita Regina Petrillo, Silas Eto Fernandes, Paulo Marcusso Fernandes, Ana Carolina da Silva, Marina Tie Shimada, Hurzana de Mello, Ed Johnny Da Rosa Prado, Alessandra Cristina de Moraes e aos colegas do Departamento de Patologia Veterinária Mayra Araguaia Pereira Figueiredo, Gabriela Noronha de Toledo, Pamela Reina e os demais não citados nominalmente, pela amizade, convívio e apoio;

Aos colegas German Coscelli, Paolo Ronza, Roberto Bermúdez Pose da Universidad Santiago de Compostela (Espanha), pela amizade e colaboração;

À professora Julieta Rodini Engrácia de Moraes pela amizade e por ceder o laboratório para as análises de imuno-histoquímica;

Ao professor Marco Antonio de Andrade Belo, pela amizade e sugestões na análise estatística;

Ao professor Gener Tadeu Pereira, pela ajuda na análise estatística.

Aos funcionários, Francisca de Assis Ardison, Maria Inês Yamazaki de Campos, pela ajuda na confecção do material para histopatologia;

À secretária do Departamento de Patologia Moema Makiko Ogassavara pela amizade e colaboração;

À Fundação Ataulpho de Paiva (Fap) pela doação das vacinas de BCG;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio à pesquisa Processos 2009/17640-7; 2010/08624-5;

À Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho – FCAV  
Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização deste curso;

A cada um dos professores que contribuíram com seus conhecimentos  
em minha formação;

À família Pereira Figueiredo, pelo apoio incondicional e por permitirem  
fazer parte desta linda família;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para o  
desenvolvimento deste trabalho;

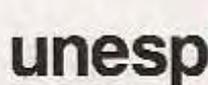
Aos peixes, por serem motivo de muitas perguntas.....

A todos muito obrigado.

## SUMARIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	2
3.1. Inflamação em peixes .....	2
3.1.1 Inflamação crônica .....	3
3.1.2 Células gigantes multinucleadas e granulomas em peixes .....	4
3.2 Centro de Melanomacrófagos (CMMs) .....	4
3.2.1 Pigmentos dos centros de melanomacrófagos (CMMs) .....	6
3.3 Função dos centros de melanomacrófagos (CMMs) .....	8
3.4 Imuno-histoquímica .....	9
3.5 Lectino – histoquímica .....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	11
4.1 Acondicionamento dos peixes .....	11
4.2 Delineamento experimental e análise estatística .....	12
4.3 Anestesia .....	13
4.4 Indução do processo inflamatório com BCG .....	13
4.5 Implante da lamínula .....	14
4.6 Colheita e fixação do material .....	14
4.7 Colorações para análise histopatológica .....	15
4.8 Análise imuno-histoquímica .....	15
4.9 Análise lectino-histoquímica .....	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
5.1. Avaliação do processo inflamatório em <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> .....	19
5.1.1 Grupo Inoculado .....	19
5.2 Avaliação do implante de lamínulas em <i>O. niloticus</i> e <i>P. mesopotamicus</i> .....	32
5.3 Avaliação dos centros de melanomacrófagos (CMMs) .....	38
5.4. Imuno-histoquímica .....	47
5.4.1 Anti-citoqueratina .....	47
5.4.2 Anti- proteína S-100 .....	48
5.4.3 Anti-iNOS (Óxido nítrico induzível) .....	50

5.5 Lectino-histoquímica .....	51
5.5.1 WGA (Wheat Germ agglutinin).....	51
5.5.2 DBA ( <i>Dolichos biflorus</i> agglutin).....	52
5.5.3 HPA ( <i>Helix pomatia</i> agglutinin) .....	54
6. CONCLUSÕES .....	55
7. REFERÊNCIAS.....	55



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 020092/09 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo comparativo da resposta inflamatória granulomatosa induzida em pacu (*Piaractus mesopotamicus*) por corpo estranho e BCG**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flavio Rues de Moraes está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de outubro de 2009.

Jaboticabal, 13 de outubro de 2009.

**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEUA

**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEUA

**ESTUDO COMPARATIVO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CRÔNICA  
INDUZIDA EM *Piaractus mesopotamicus* E *Oreochromis niloticus* POR  
CORPO ESTRANHO E BACILO DE CALMETTE - GUÉRIN**

**RESUMO** - A piscicultura está caracterizada pela alta densidade de estocagem, transporte e altos níveis de arraçoamento, alterando a qualidade de água e a homeostase dos peixes. Uma das principais características frente a estas alterações é a resposta geral de adaptação, aumentando a susceptibilidade dos peixes às doenças infecciosas e parasitárias ao mesmo tempo em que a má qualidade da água particularmente quando rica em matéria orgânica, favorece a proliferação de agentes com potencial. Um dos processos fisiopatológicos de grande importância para manter a saúde do hospedeiro é a resposta inflamatória aguda que se cronifica com a persistência do agente. O implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de peixes induz a resposta inflamatória crônica, apresentando acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes multinucleadas. O inóculo do BCG induz intenso infiltrado mononuclear com desorganização do tecido causado por edema com dissociação das fibras musculares e necrose. O surgimento de células gigantes ocorre de forma progressiva e com o tempo estas aumentam de tamanho e número de núcleos formando células gigantes tipo corpo estranho. Com o avanço do processo a disposição dos macrófagos ao redor do inóculo é maior e surgem fibroblastos, linfócitos e na maioria dos casos presença de melanomacrófagos formando o granuloma. Neste trabalho objetivou-se caracterizar morfológicamente o processo inflamatório crônico por corpo estranho induzido pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo e o epitelióide induzido pelo inóculo de BCG em *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*. 180 peixes de cada gênero foram utilizados no estudo, divididos em quatro grupos de 45 cada. Os tratamentos foram: Inoculados, Implantados, Inoculado e Implantados e grupo controle. Nos grupos inoculados foram injetados 20 µL de vacina de BCG (40 mg/mL) (nº de bacilos vivos superior a  $2,0 \times 10^6$  UFC/mg de BCG Cepa Mureau Rio de Janeiro) na musculatura estriada esquelética. No grupo implantado foi colocado no tecido subcutâneo uma lamínula de vidro estéril de 9 mm de diâmetro. No grupo

inoculado e implantado foram realizados ambos procedimentos. O grupo controle não foi manipulado. Na análise das lamínulas em ambas as espécies observou-se que a espécie *O. niloticus* teve resposta mais rápida quanto à formação de células Langhans do que o *P. mesopotamicus* e que o estímulo imune não interfereu na resposta inespecífica. A formação dos CMMs depende de vários fatores, entre eles a espécie, tempo e tipo de estímulo. Na análise imuno-histoquímica caracterizaram-se macrófagos e células epitelióides com os anticorpos iNOS, S-100 e citoqueratina classificando assim o granuloma como epitelióide. Na análise lectino-histoquímica as lectinas WGA, DBA e HPA permitiram identificar seus receptores em macrófagos com atividade fagocítica, fibroblastos e bacilos no granuloma epitelióide induzido pelo BCG.

**Palavras-chave:** centros de melanomacrófagos, granuloma, imuno-histoquímica, lectino-histoquímica, teleósteos

## COMPARATIVE STUDY OF CHRONIC INFLAMMATORY RESPONSE INDUCED IN *Piaractus mesopotamicus* AND *Oreochromis niloticus* BY FOREIGN-BODY AND BACILLUS CALMETTE - GUERIN

**ABSTRACT-** Fish farming is characterized by high stocking density, transport and high levels of feeding, changing water quality and fish homeostasis. A major characteristic of these changes is opposite the overall response adjustment, increasing the susceptibility of fish to infectious and parasitic diseases at the same time that poor water quality particularly when rich in organic matter, favors the proliferation of agents with potential. One of the pathophysiological processes of major importance for maintaining the health of the host is the acute inflammatory response that chronic the persistence of the agent. The implantation of glass coverslips in the subcutaneous tissue of fish induces chronic inflammatory response, with accumulation of macrophages and multinucleated giant cell formation. The inoculum of BCG induces intense mononuclear infiltrate with disruption caused by tissue dissociation with edema and necrosis of muscle fibers. The emergence of giant cells occurs gradually and over time they increase in size and number of cores forming giant cells of foreign body type. With the progress of the process layout of macrophages around the inoculum is larger and appear fibroblasts, lymphocytes and in most cases the presence of melanomacrophages forming the granuloma. This study aimed to characterize morphologically the chronic inflammatory process induced by foreign body implant glass slides in the subcutaneous tissue and epithelioid induced by inoculation of BCG in *Piaractus mesopotamicus* and *Oreochromis niloticus*. 180 fish in each sex were used in the study were divided into four groups of 45 each. The treatments were: inoculated, deployed, deployed and Inoculated and control group). In inoculated groups were given 20  $\mu$ l of BCG vaccine (40 mg/mL) ( $n^{\circ}$  bacilli than  $2.0 \times 10^6$  CFU / mg of BCG strain Mureau Rio de Janeiro) in skeletal striated muscle. In the group implanted in the subcutaneous tissue was placed a coverslip glass 9 mm in diameter. In the group inoculated and both procedures were performed implanted. The control group was not manipulated. In the analysis of coverslips in both species was observed that the species does not *O. niloticus* had faster response when the cell formation Langhans than *P. mesopotamicus* and that the stimulus did not interfere with the immune response nonspecific. The formation of CMMs

depends on several factors, including the type, time and type of stimulus. In immunohistochemical analysis characterized macrophages and epithelial cells with antibodies iNOS, cytokeratin and S-100 thus classified as epithelioid granuloma. In the analysis lectino staining lectins WGA, DBA and HPA have identified receptors on macrophages with phagocytic activity, fibroblasts and bacilli in epithelioid granuloma induced by BCG.

**Keywords:** melanomacrophages centers, granuloma, immunohistochemistry, lectin histochemistry, teleost

**LISTA DE ABREVIATURAS**

BCG	=	Bacilo de Calmette - Guérin
CD 57	=	Cluster de diferenciação 57
CD54	=	Cluster de diferenciação 54
CD3	=	Cluster de diferenciação 3
CMMs	=	Centro de Melanomacrófagos
DAB	=	Diaminobenzidina
DBA	=	<i>Dolichos biflorus</i> agglutinin
HE	=	Hematoxilina - eosina
HPA	=	<i>Helix pomatia</i> agglutinin
iNOS	=	Óxido nítrico induzível
MHC II	=	Complexo maior de histocompatibilidade
WGA	=	Wheat germ agglutinin
ZN	=	Ziehl-Neelsen

## LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição de cada grupo de peixes ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> ) nos diferentes tratamentos e tempos de coletas.....	13
Tabela 2. Condições para imunomarcção de cada anticorpo utilizado na marcação de células no granuloma induzido em <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> ....	17
Tabela 3. Condições para marcação das lectinas utilizadas para marcação de células no granuloma induzido em <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Oreochromis niloticus</i> .....	19
Tabela 4. Valores médios <sup>1</sup> transformados em $\log(x+1)$ , e resultado da análise de variância <sup>2</sup> das contagens de células nas lamínulas coletas em 3, 7, 14, 21 e 33 dias após os estímulos em <i>Oreochromis niloticus</i> submetidas aos tratamentos implante e implante/inóculo.....	34
Tabela 5. Valores médios <sup>1</sup> transformados em $\log(x+1)$ , e resultado da análise de variância <sup>2</sup> das contagens de células nas lamínulas coletas 3, 7, 14, 21 e 33 dias após o implante em <i>Piaractus mesopotamicus</i> , submetidas aos tratamentos implante e implante/inóculo.....	36
Tabela 6. Valores médios e resultado da análise de variância (ANOVA) <sup>1</sup> das medidas das áreas dos CMMs <sup>2</sup> presentes no baço de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	42
Tabela 7. Valores médios e resultado da análise de variância (ANOVA) <sup>1</sup> das contagens dos CMMs presentes no baço de <i>Oreochromis niloticus</i> .....	44

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Tanques onde foram distribuídos os peixes de ambas as espécies.....	12
Figura 2. Exemplar de <i>Piaractus mesopotamicus</i> implantado com lamínula .....	14
Figura 3. Fotomicrografia de músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se o centro do inoculo de BCG (I), macrófagos com conteúdo fagocitado (M), tecido conectivo (*) e bacilos (setas) (ZN). Barra = 6 $\mu$ m.....	20
Figura 4. Fotomicrografia de músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 3 dias após a inoculação do BCG. Observam-se células gigantes multinucleadas com conteúdo fagocitado (seta), necrose tecidual (N), edema intersticial (E), fibras musculares (*) e plasmócito (ponta da seta) (HE). Barra = 30 $\mu$ m.....	21
Figura 5. Fotomicrografia de músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 3 dias após a inoculação do BCG. Observa-se células gigantes multinucleadas com conteúdo fagocitado (G), necrose tecidual (N), edema intersticial (E), e macrófagos com material fagocitado (grumos de BCG) (M) (HE). Barra = 20 $\mu$ m.....	21
Figura 6. Fotomicrografia de músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 3 dias após a inoculação do BCG. Observa-se em detalhe uma célula gigante com os núcleos dispostos na periferia celular (tipo Langhans), macrófagos com evidencia de núcleo e nucléolos (M) e necrose tecidual (N) (HE). Barra = 6 $\mu$ m.....	22
Figura 7. Fotomicrografia de músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 3 dias após a inoculação do BCG. Observam-se melanomacrófagos (seta), edema (E), desarranjo das fibras musculares (*), Infiltrado mononuclear (I) macrófago (ponta da seta) e célula gigante multinucleada (G) (HE). Barra = 20 $\mu$ m.....	22

- Figura 8. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 3 dias após a inoculação do BCG. Observam-se melanomacrófagos (seta), edema (E), desarranjo das fibras musculares (\*), Infiltrado mononuclear (I) macrófago (ponta da seta) e célula gigante multinucleada (G) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 23
- Figura 9. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 7 dias após a inoculação do BCG. Observam-se melanomacrófagos (seta), célula gigante multinucleada (G), edema (E), macrófago (cabeça de seta), músculo (\*) e infiltrado mononuclear (I) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 24
- Figura 10. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 7 dias após a inoculação do BCG. Observa-se o início da formação do granuloma com macrófagos (G), presença de células fibroblásticas (\*), plasmócitos (ponta da seta) e célula em mitose (seta) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 24
- Figura 11. Fotomicrografia do músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se a disposição dos granulomas (G) com presença de fibroblastos ao redor (\*), infiltrado mononuclear (I), músculo esquelético (M) e melanomacrófagos (seta) (HE). Barra = 200  $\mu\text{m}$ ..... 25
- Figura 12. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se a formação do granuloma com necrose central (N), presença fibroblastos ao redor (seta), infiltrado mononuclear (I), músculo esquelético (M) e melanomacrófagos (cabeça de seta) (HE). Barra = 30  $\mu\text{m}$ ..... 26
- Figura 13. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se a formação do granuloma com o inóculo (N), macrófagos (com núcleo e nucléolo) (M), células epitelióides (\*), linfócito (L), fibroblastos (seta), hemossiderina (ponta da seta) (HE). Barra = 6  $\mu\text{m}$ ..... 26

- Figura 14. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observam-se os granulomas (G), edema intersticial (E), infiltrado mononuclear (I), pigmentação associada à presença de melanomacrófagos (seta) (HE). Barra = 200  $\mu\text{m}$ ..... 27
- Figura 15. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observam-se os granulomas (G), edema intersticial (E), infiltrado mononuclear (I), pigmentação associada à presença de hemácias (seta) (HE). Barra = 60  $\mu\text{m}$ ..... 28
- Figura 16. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) com fibroblastos (seta) e hemossiderina (\*) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 28
- Figura 17. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se os granulomas (G) formando um único granuloma, infiltrado mononuclear (I) e hemossiderina (seta). (HE). Barra = 200  $\mu\text{m}$ ..... 29
- Figura 18. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se a necrose central do granuloma (N), fibras colágenas (\*), fibroblastos rodeando a camada de macrófagos (seta), macrófago (M), melanomacrófago (cabeça de seta), linfócito (L), eritrócito (E) e vaso sanguíneo (V) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ ..... 30
- Figura 19. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se o inóculo no centro do granuloma (N), células epitelióides (\*), fibroblastos rodeando a camada de macrófagos (seta), macrófagos (M), melanomacrófagos (cabeça de seta) e linfócito (L) (HE). Barra = 6  $\mu\text{m}$ ..... 30
- Figura 20. Fotomicrografia de célula gigante multinucleada tipo corpo estranho em lamínula implantada. Sétimo dia após o implante em *Piaractus mesopotamicus*. Hematoxilina de Harris. Barra = 10  $\mu\text{m}$ ..... 32

Figura 21.	Fotomicrografia de célula gigante multinucleada tipo Langhans (CGM) e macrófagos (M). Trigésimo terceiro dia após o implante em <i>Piaractus mesopotamicus</i> . Hematoxilina de Harris. Barra = 10 $\mu\text{m}$ .....	33
Figura 22	Fotomicrografia de baço de <i>Piaractus mesopotamicus</i> vinte e um dias após o implante e inóculo de BCG. Em detalhe vasos sanguíneos (V), nódulos linfóides (N) e sinusoides (S). Nota-se a ausência de centro de melanomacrófagos. (HE). Barra = 6 $\mu\text{m}$ .....	39
Figura 23.	Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (seta) em <i>Oreochromis niloticus</i> . Grupo controle. (Perl's). Barra = 20 $\mu\text{m}$ .....	39
Figura 24.	Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (seta) em <i>Oreochromis niloticus</i> . Tratamento BCG dia 21. Negativo para melanina e lipofuscina. (Schmorl's). Barra = 6 $\mu\text{m}$ .....	40
Figura 25.	Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (seta) em <i>Oreochromis niloticus</i> . Grupo controle. (Azul de toluidina). Barra = 6 $\mu\text{m}$ .....	40
Figura 26.	Fotomicrografia do músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50 $\mu\text{m}$ . Em detalhe, imunomarcção para citoqueratina de células epitelióides (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (seta) (DAB). Barra = 10 $\mu\text{m}$ .....	48
Figura 27.	Fotomicrografia do músculo de <i>Piaractus mesopotamicus</i> 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50 $\mu\text{m}$ . Em detalhe, macrófagos imunomarcados para proteína S-100 (cabeça de seta), fibroblastos (estrela) e linfócitos (seta) (DAB). Barra = 10 $\mu\text{m}$ .....	49

- Figura 28. Fotomicrografia do músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50  $\mu\text{m}$ . Em detalhe, imunomarcção para iNOS em linfócitos (seta) e macrófagos (cabeça de seta). (DAB). Barra = 10  $\mu\text{m}$ ..... 50
- Figura 29. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observam-se macrófagos marcados no citoplasma (cabeça de seta) e células epitelióides que não foram marcadas (seta) com a lectina WGA). LHQ. Barra = 10  $\mu\text{m}$ ..... 51
- Figura 30. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observa-se leve marcação com DBA nos macrófagos (estrela) e forte marcação em fibroblastos (cabeça de seta), as células epitelióides não foram marcadas (seta). LHQ. Barra = 10  $\mu\text{m}$ ..... 53
- Figura 31. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observou-se marcação da HPA em macrófagos (cabeça de seta) e marcação leve nos fibroblastos (estrela). LHQ. Barra = 10  $\mu\text{m}$ ..... 54

## 1. INTRODUÇÃO

Na piscicultura, a alta densidade de estocagem atua como elemento estressante e compromete a qualidade da água. Esses fatores aumentam a susceptibilidade dos peixes às doenças infecciosas e parasitárias e facilita a proliferação de agentes com potencial patogênico no ambiente de criação.

Um dos processos fisiopatológicos de grande importância para manter a saúde do hospedeiro é a resposta inflamatória, cujos mecanismos são bem conhecidos em mamíferos, mas pouco claros em outras classes do reino animal. Nos peixes, esse fenômeno também não é bem conhecido e merece atenção do ponto de vista da fisiopatologia comparada, assim como pelo potencial socioeconômico que representam.

A resposta inflamatória envolve vários eventos como a participação de células teciduais fixas, leucócitos, trombócitos, mediadores farmacológicos celulares e plasmáticos, além de moduladores diversos de origem hormonal e não hormonal. Vários estudos desenvolvidos em peixes descrevem a formação de células gigantes multinucleadas em processos inflamatórios crônicos, como os descritos em diversas enfermidades infecto-contagiosas, tais como a causada pela *Edwardsiella tarda* em tilápia nilótica (MIYAZAKI e KAIGE, 1985), *Ichthyophonus hoferi* em *Pleuronectes plateas* (TIMUR e TIMUR, 1984) e *Mycrospoilium sp.* na musculatura esquelética de *Trisopterus esmarkii* (PUSLFORD e MATHUS, 1991).

O implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo de peixes induz a resposta inflamatória crônica, apresentando acúmulo de macrófagos e formação de células gigantes multinucleadas (PETRIC et al., 2003; BELO et al., 2005).

O significado de células gigantes multinucleadas em lesões inflamatórias crônicas não é completamente conhecido. Elas formam-se pela fusão das membranas de macrófagos, sendo dependentes do recrutamento de monócitos do sangue que por sua vez são requeridos aos compartimentos de reserva e dependentes da taxa de renovação do granuloma (RYAN e SPECTOR, 1970).

Há evidências de que a formação de células gigantes multinucleadas depende da natureza do estímulo, corroborando a idéia de taxa de renovação macrofágica dentro da lesão (BIRMAN e MARIANO, 1985).

## 2. OBJETIVOS

Estudar comparativamente a cinética da resposta inflamatória crônica induzida pelo implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo e pelo implante associado à inoculação de BCG em *Piractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*.

Mais detalhadamente,

Avaliar morfológicamente ambas as respostas em termos de tipos celulares e suas características morfológicas e tintoriais.

Analisar a cinética de macrófagos, células gigantes multinucleares e células Langhans nas lamínulas implantadas em ambas as espécies.

Determinar a constituição pigmentar, tamanho e número dos centros de melanomacrófagos do baço de *O. niloticus* nos diferentes tratamentos e no controle.

Determinar as células que participam no processo inflamatório crônico com uso de anticorpos e lectinas em ambas as espécies.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Inflamação em peixes

Metchnikoff (1891) realizou o primeiro estudo sobre o processo inflamatório em peixes, no qual observou o fenômeno da fagocitose “*in vivo*”, após injetar eritrócitos de cobaia na cavidade celomática de *Carassius auratus*.

Outros autores também verificaram o fenômeno da fagocitose injetando várias substâncias. Cuenot (1907) relata o processo inflamatório após injeção de tinta da China na cavidade celomática de peixes. Jakowska e Nigrelli (1953) iniciaram o estudo experimental do processo inflamatório por meio da inoculação de agentes biológicos em peixes, na qual relataram as observações sobre as lesões induzidas pela inoculação de *Mycobacterium* sp. em *Poecilia reticulata*, caracterizando-se inicialmente por exudação composta predominantemente por eosinófilos, que apresentavam granulação grosseira e características fagocíticas. Após dois dias da inoculação do agente, havia predomínio de macrófagos e formação de tecido granulamatoso.

### 3.1.1 Inflamação crônica

A resposta inflamatória pode ser definida sob duas formas, aguda e crônica. A inflamação aguda caracteriza-se como processo exsudativo do qual participam vasos e células com produção de exsudato rico em líquido, proteínas e células. O processo crônico é de natureza proliferativa e tem como principais componentes as células mononucleares, tecido conectivo e neo-vasos (GAUTHIER et al., 2004). Os granulomas podem ser denominados “granulomas por corpo estranho” e “granulomas imunes”. O primeiro é formado em resposta a partículas inertes, como talco e fio de sutura cirúrgica, caracterizado pela presença de camadas de macrófagos e células gigantes multinucleadas, com o inóculo no centro da lesão; o segundo é formado em resposta às partículas insolúveis com capacidade de estimular a resposta imune celular, como na micobacteriose ou com a utilização do BCG - cepas atenuadas de *Mycobacterium* sp. Esses são compostos por células epitelióides com conteúdo do inóculo na região central do granuloma e fibroblastos (GAUTHIER et al., 2004).

Em peixes derivados (evoluídos filogeneticamente) como do gênero *Oreochromis* sp. Matushima (1994) avaliou a resposta inflamatória crônica granulomatosa e observou que a mesma é composta por células epitelióides circunscritas ao inóculo, apresentando citoplasma vacuolizado e núcleo contendo cromatina frouxa, podendo conter células pigmentares ao redor do granuloma, característica também observada por Chinabut (1990), Colorni et al., (1990) e Ramos (2000). Em contrapartida, na maioria dos peixes teleósteos primitivos há formação de células gigantes multinucleadas circunscrevendo o patógeno no decorrer do processo inflamatório sem a formação de granuloma e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides (GOMÉZ, 1998; TALAAT et al., 1999; HOWARD e BYRD, 2000).

Sado e Matushima (2007) descreveram diferenças histológicas, histoquímicas e ultra-estruturais na resposta inflamatória crônica em peixes pertencentes a diferentes posições filogenéticas, ou seja, primitivos, intermediários e modernos. Nos peixes modernos, na formação do granuloma imune, os macrófagos se diferenciam em células epitelióides, ao passo que em peixes primitivos, os macrófagos se diferenciam em células gigantes multinucleadas, sem a formação de granuloma.

### 3.1.2 Células gigantes multinucleadas e granulomas em peixes

Estudos feitos em animais de laboratório por meio do implante de lamínulas de vidro no tecido subcutâneo demonstraram que em granulomas tipo corpo estranho, formam-se células gigantes multinucleadas pela fusão das membranas celulares de macrófagos derivados de monócitos originários da corrente sanguínea (GILLMAN e WRIGHT, 1996; MARIANO e SPECTOR, 1974).

A taxa de acúmulo de macrófagos em lamínulas de vidro depende da natureza da reação inflamatória e do tecido conectivo que a envolve. Conforme demonstrado por Birman e Mariano (1985), a inoculação de BCG (Bacilo Calmette–Guérin) no local do implante da lamínula, causa drástica redução na formação de células gigantes multinucleadas, redução do número de núcleos/célula gigante e bloqueio na transformação de células tipo corpo estranho para célula tipo Langhans. Este fenômeno pode ser explicado pelo fato do BCG vivo provocar alta taxa de renovação do granuloma. O contrário ocorre com a inoculação de carragenina, pois esta substância induz a formação de granuloma de baixa renovação constituído quase que exclusivamente por macrófagos.

Em animais aquáticos, Peingnoux-Deville et al. (1989) demonstraram que há presença de células gigantes multinucleadas circundando a área de implante de tecido ósseo desmineralizado de *Anguilla anguilla*, em tecido muscular de *Scyliorhinus canícula* dois meses e meio após o implante.

Matushima (1994) avaliou o processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pela inoculação intramuscular de BCG em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) e observou a presença de células gigantes multinucleadas tipo corpo estranho três dias após a inoculação, que apareceram com maior frequência aos sete dias. Após 21 dias, estas já possuíam maior organização e, aos 33 dias células gigantes multinucleadas do tipo corpo estranho já podiam ser encontradas englobando grumos de BCG. Estas células também podiam ser encontradas em locais mais distantes formando “ninhos” de células inflamatórias junto com linfócitos, fibroblastos e macrófagos.

### 3.2 Centro de Melanomacrófagos (CMMs)

Centro de melanomacrófagos são agrupamentos de células que contêm pigmentos, geralmente encontradas dentro do retículo - endotelial na matriz dos

tecidos hematopoiéticos. Em teleósteos, a hematopoiese está principalmente localizada dentro do estroma do baço e no interstício do rim. Em menor escala, apresentam também elementos hematopoiéticos em áreas periportais do fígado, submucosa do intestino e timo, órgãos onde também podem se formar. Existem artigos descrevendo a presença de CMMs em brânquias, cérebro e gônadas (MACCHI et al., 1992).

O termo centros de melanomacrófagos (CMMs) foi aplicado pela primeira vez para estruturas de peixes teleósteos (ELLIS 1974; ROBERTS 1975). Blumenthal (1908) foi o primeiro autor a fazer referência aos CMMs em peixes, quando descreveu grandes nódulos de macrófagos contendo glóbulos vermelhos degenerados e composto férrico no baço. Morfologicamente, os CMMs são nodulares, com uma delicada cápsula e geralmente estreita, aplicadas aos canais vasculares (AGIUS, 1979a).

Os macrófagos estão normalmente embalados em pacotes formando grandes agregados e são maiores após atividade fagocítica de material heterogêneo, como partículas celulares, pigmentos de melanina, grânulos de hemossiderina e resíduos de lipofuscina (AGIUS e AGBEDE, 1984; AGIUS, 1985) bem como gotículas lipídicas, agregados protéicos e mucopolissacarídeos (HERRAEZ e ZAPATA, 1986).

O aspecto morfológico dos CMMs pode variar em diferentes espécies (ROBERTS, 1975; AGIUS, 1980), órgãos (AGIUS, 1979b; KRANZ e PETERS, 1984), e diferentes condições fisiológicas dentro da mesma espécie, tais como a idade (AGIUS 1979a; AGIUS e ROBERTS, 1981; WOLKE et al., 1985; KRANZ e GERCKEN, 1987), inanição (AGIUS, 1983; AGIUS e AGBEDE, 1984; MIZUNO et al., 2002), tipo de tecido (KRANZ, 1989) metabolismo de ferro e hemoglobina (FULOP e McMILLAN, 1984), condições anatomopatológicas e inflamatórias (ELLIS, 1980; VOGELBEIN et al., 1987) e processos imunes (AGIUS 1981, 1985; FÜLÖP e McMILLAN, 1984).

Ultraestruturalmente, os melanomacrófagos são complexos, apresentam núcleos indentados e grande número de membranas vinculadas a vacúolos que contêm vários tipos de material. O pigmento granular parece estar contido nos vacúolos, sugerindo atividade fagocítica (ROBERTS, 1975). A aparência, o tamanho e morfologia dos CMMs nos teleósteos diferem entre indivíduos, espécie e órgãos

(WOLKE, 1992; MESEGUER et al., 1994; HAAPARANTA et al., 1996; AGIUS e ROBERTS, 2003). É ainda incerto se esta variação reflete a idade, o estado de saúde ou circunstâncias de estresse como a inanição ou a presença de poluentes na água (AGIUS e ROBERTS, 2003; HUR e NIGRELLI, 2006; FISHELSON, 2006).

Leknes (2007) sugeriu que os macrófagos do rim e baço dos “platyes” após injetar ferritina de cavalo no tecido hematopoiético, podem ter papel importante na limpeza de macromoléculas e de partículas exógenas presentes na circulação.

Estudos filogenéticos feitos em peixes teleósteos sugerem que os melanomacrófagos livres e CMMs são precursores de células dendríticas foliculares e centros germinativos respectivamente, demonstrando uma relação evolutiva entre os CMMs de peixe e os centros germinativos de aves e mamíferos (VIGLIANO et al., 2006).

### **3.2.1 Pigmentos dos centros de melanomacrófagos (CMMs)**

A melanina é definida como toda inclusão biológica de cor amarela acastanhada e substâncias orgânicas pretas que são polímeros policíclicos de alto peso molecular, insolúveis na maioria dos solventes, e resistentes a todos os ácidos ou técnicas de digestão (EDELSTEIN, 1971).

Posteriormente foi evidenciado que CMMs possuem diferentes tipos de pigmentos. Mediante técnicas histoquímicas, três tipos de pigmentos foram descritos em melanomacrófagos, sendo melanina, lipofuscina, e hemossiderina (AGIUS e ROBERTS, 2003).

Dentro dos macrófagos, geralmente a lipofuscina parece ser o pigmento mais abundante; a hemossiderina pode estar presente em grande quantidade, em certas condições como na anemia hemolítica; a melanina frequentemente está presente (AGIUS e ROBERTS, 2003).

#### **3.2.1.1 Melanina**

A melanina é produzida pelos melanócitos derivados embriologicamente da crista neural e contidos nos melanossomos. É um pigmento negro, finamente granulado quando corado com HE (ROBERTS, 1975).

Nos peixes a melanogênese ocorre na derme e os geradores de células pigmentares de melanina são os melanócitos. A melanina é constituída de polímeros complexos que podem absorver e neutralizar os radicais livres, e outros cátions potencialmente tóxicos, derivados da degradação fagocítica de material celular (ZUASTI et al., 1989). Este polímero teria papel relevante no interior de macrófagos como neutralizador de radicais livres liberados no catabolismo de ácidos graxos de membranas celulares após a fagocitose a baixas temperaturas (AGIUS e AGBEDE, 1984). WOLKE et al., (1985) sugeriram que a melanina pode ser importante na produção de compostos bactericidas, especialmente de peróxido de hidrogênio.

### **3.2.1.2 Lipofuscina**

A lipofuscina resulta do processo oxidativo e polimerização de ácidos graxos poliinsaturados e podem se acumular nos peixes, como resultado de deficiências nutricionais, doenças bacterianas e virais e distúrbios causados por materiais tóxicos (PICKFORD, 1953).

Pigmentos de lipofuscina ou de ceróides são produtos do processo oxidativo de difícil distinção entre os dois produtos de degradação. Portanto, a aplicação de uma série de técnicas histoquímicas é necessária para identificá-los (PEARSE, 1972).

Este é o pigmento mais achado nos CMMs de muitas espécies de peixes (AGIUS, 1979 a,b), e é amplamente distribuído no homem, aves, répteis e anfíbios.

Agius e Agbede (1984) observaram que a principal fonte de grânulos de lipofuscina são de componentes celulares como a degeneração mitocondrial pelo processo de peroxidação lipídica mitocondrial.

### **3.2.1.3 Hemossiderina**

Hemossiderina é de cor marrom em lâminas histológicas coradas com HE, é relativamente insolúvel, formada por proteína e componente férrico proveniente do catabolismo da hemoglobina dos eritrócitos. Nos animais superiores (mamíferos), o ferro é normalmente armazenado no organismo sob a forma de ferritina. A hemossiderina é normalmente observada em estreita associação com grânulos de lipofuscina (AGIUS e AGBEDE, 1984).

Em teleósteos, o pigmento férrico é observado particularmente nos CMMs do baço, e não é descrito em melanomacrófagos de tecidos hematopoiéticos de elasmobrânquios (AGIUS 1979a, 1983).

O aumento de hemossiderina foi observado nos CMMs após anemia hemolítica (ROBERTS, 2001) e depois de inanição prolongada (AGIUS 1981). A quantidade de hemossiderina no baço geralmente é pequena, a acumulação excessiva de pigmento é conhecida como hemossiderose, e reflete hemorragia (WOLKE et al., 1985).

### **3.3 Função dos centros de melanomacrófagos (CMMs)**

Muitas são as funções atribuídas aos CMMs, incluindo o armazenamento de células derivadas de fosfolipídeos e ferro provenientes da eritrofagocitose (AGIUS, 1979b; AGIUS e AGBEDE, 1984) e fagocitose de vários tipos de antígenos de bactérias, esporos e parasitos (ROBERTS, 1975; AGIUS, 1985). Em peixes esplenectomizados, o papel de armazenamento de ferro é assumido pelo rim formando CMMs (AGIUS, 1980).

Muitos estudos sugerem que a função geral dos centros está focalizada na destruição, desintoxicação ou reciclagem de materiais endógenos e exógenos (FERGUSON, 1976a; ELLIS, 1980; HERRAEZ e ZAPATA, 1986). Por conseguinte, uma das principais funções dos CMMs é o descarte de material originários da atividade metabólica celular e eritrocitária (ROBERTS, 1975; AGIUS, 1980; FÜLÖP e McMILLAN, 1984).

Os CMMs desempenham papel importante na resposta a agentes estranhos, incluindo os infecciosos. O papel dos CMMs no reconhecimento de antígenos pelo sistema imune foi sugerido por Ellis e De Sousa (1974). Estes autores demonstraram que pequenos linfócitos circulantes migraram para os CMMs e sugeriram que pode ser o local de interação entre as células imunitárias e os antígenos na resposta imune.

Estudos demonstram a estreita relação de CMMs com células linfóides e sugeriram que são os principais locais de retenção de antígenos a longo prazo (LAMERS e De HAAS, 1985). Estudos clínicos demonstram a associação de CMMs com alta gama de bactérias intracelulares resistentes como micobactérias, e

parasitas como *Myxobolus spp.* (ROBERTS, 2001). Por sua vez, estudos em *Salmo salar* após da injeção intraperitoneal de vacina contra *Aeromonas salmonicida*, demonstraram que houve ampla distribuição do componente lipopolissacarídeo em todo o tecido do abdome, e após da 16ª semana da exposição foram localizados CMMs no baço e rim (PRESS et al., 1996). Os mesmos autores descrevem a presença de complexos imunes e produção de níveis elevados de anticorpos. Eles sugeriram que esta retenção de antígeno e consequente ativação de macrófagos nos CMMs foi de vital importância para alcançar a memória imune.

### 3.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) é uma técnica que permite detectar antígenos em tecidos fixados (ISHIKAWA et al., 2001), fato que possibilita a posterior identificação específica de grande variedade de moléculas. Em peixes esta técnica é pouco utilizada devido à escassez de anticorpos espécie-específicos. Então se recorre a outras técnicas de maior complexidade, mas eficazes como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (MCCORMICK et al., 1995). No entanto, existe pequeno número de anticorpos específicos e inespecíficos que marcam células do sangue de algumas espécies de peixes (PRESSON 1994, FISHER et al., 2006).

Noga et al. (1989) estudaram a imunomarcagem com anticorpo para citoqueratina humana em peixes teleósteos e observaram positividade por reação cruzada nas células epitelióides. Também foi descrita a imunomarcagem por este tipo de reação de CD54 e CD57 em *Cyprinus carpio* e *Oncorhynchus mykiss* (FISHER e KOELLNER, 2007). A imunomarcagem de macrófagos e células epitelióides no granuloma induzido pelo inóculo do bacilo Calmette-Guérin (BCG) em *Centropomus spp.* levou à compreensão da formação granulomatosa em varias espécies de peixes de diferentes posições na escala filogenética (SADO e MATUSHIMA 2007, 2008). O uso da imunomarcagem com anticorpos poli e monoclonais em peixes infectados com *M. paratuberculosis* e *M. avium* constatou que a técnica de IHQ é válida para o diagnóstico de micobacteriose em peixes (GÓMEZ et al., 1993), assim como para o *M. marinum* (ROMANO et al., 2012).

Por outro lado, a identificação do óxido nítrico (NO) como molécula mediadora da resposta inflamatória (KUMAR et al., 2005), incentivou a procura de técnicas para identificar a presença e participação desta e seus derivados neste evento. Assim, com uso da PCR ficou demonstrada a expressão da sequência de RNA mensageiro que codifica a síntese do óxido nítrico induzível (iNOS), evidenciando sua participação na inflamação crônica de peixes, de forma similar ao observado em mamíferos (LAING et al., 1996).

Estudos realizados em truta arco-íris (*Oncorhynchus mikyss*) sugerem a participação do iNOS na resposta imune contribuindo com a função protetora contra agentes patogênicos (CAMPOS-PEREZ et al., 2000). Na formação do granuloma tipo corpo estranho demonstrou-se a função do fator desativador de macrófagos (MDF) associado à proteína ligante de cálcio - MRP-14, relacionada ao fator inibidor da migração de macrófagos, expressa por células epitelióides de granulomas. Esta proteína pertence à família das proteínas ligantes de cálcio S-100, presentes em neutrófilos e macrófagos e está associada à manutenção do granuloma (Mariano, 1995).

### **3.5 Lectino – histoquímica**

As lecitinas são proteínas de origem não imune que se ligam específica e reversivelmente a açúcares e amplamente utilizadas nas áreas biológica e médica, devido às propriedades de reconhecimento de moléculas (LEHMANN et al., 2006). Encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microorganismos (LIS e SHARON 1986, MODY et al., 1995, KENNEDY et al., 1995), frequentemente localizam-se na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON e LIS 1989). Estas são usadas como sondas para o prognóstico e/ou diagnóstico de doenças humanas e animais (Mitchell e Schumacher 1999), assim como método de diagnóstico laboratorial de várias doenças infecciosas (DOYLE e SLIFKIN 1994, SLIFKIN e DOYLE 1990, ASTOUL et al., 2000) e parasitárias (JACOBSON e DOYLE 1996, RESTREPO et al., 2000, JARROLL et al., 2001, ROBIJN et al., 2007). Nas técnicas histoquímicas as lecitinas de diferentes especificidades oferecem um sistema de detecção sensível para alterações da glicosilação e expressão de

carboidratos que podem ocorrer durante o desenvolvimento embrionário e em diferentes doenças (WRÓBLEWSKI et al., 2000, 2001; BELTRÃO et al., 2003). Por serem sensíveis, estáveis e de fácil manuseio tornam-se úteis para diferenciar alterações celulares (JI et al., 2005).

A interação lecitina-carboidrato é utilizada para estudar o desenvolvimento da resposta imune induzida por diferentes antígenos em animais por meio do uso de conjugados antigênicos (HUNDT et al., 2000) e como técnica rápida e de baixo custo para a diferenciação de várias espécies de micobactérias (ATHAMNA et al., 2006).

#### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi conduzido no Centro de Pesquisas em Sanidade Animal (CPPar) e Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP, Jaboticabal, Estado de São Paulo durante o período de agosto de 2009.

O estudo experimental foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais – CEUA, sob o protocolo número 020092/09 em reunião ordinária de 08 de outubro de 2009.

##### **4.1 Acondicionamento dos peixes**

Foram utilizados 180 peixes de cada espécie (*Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*). Os grupos foram formados por peixes jovens, entre machos e fêmeas, com peso entre 100 e 120 g. Inicialmente os peixes foram submetidos a um período de aclimação durante uma semana e em seguida foram aleatoriamente redistribuídos em tanques com capacidade de 250 L abastecidos com água proveniente de poço artesiano (Figura 1). A alimentação foi realizada duas vezes ao dia com ração comercial (28% de proteína bruta). Todos os dias foram medidos os parâmetros físico-químicos da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) (Sonda multiparamétrica YSI 6820) às 14:00 horas.



Figura 1. Tanques onde foram distribuídos os peixes de ambas as espécies.

#### **4.2 Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em sistema fatorial 3 x 5 (três tratamentos “BCG, BCG+IMP e IMP”, cinco coletas). Foram divididos em 4 grupos de 45 animais/grupo sendo estes subdivididos em 3 grupos com 15 animais por tanque para cada gênero (Tabela 1) por espécie. Cada peixe foi considerado como uma unidade experimental.

Para a análise estatística utilizou-se o pacote estatístico Statistical Analyses System (SAS) v.9.0. Para a análise dos macrófagos nas lamínulas os valores médios foram transformados em  $\log(x+1)$ , e o resultado foi analisado mediante análise de variância seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para os CMMs os valores da média de 175 observações (área e número) foram analisados mediante ANOVA seguido do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabela 1. Distribuição de cada grupo de peixes (*Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*) nos diferentes tratamentos e tempos de coletas.

Grupo experimental (número de peixes)	Dias de coletas				
	3°	7°	14°	21°	33°
Controle (Sem inoculação/implante) (n=45)	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9
Inoculado com BCG (n=45)	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9
Implantado com lamínula (n=45)	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9
Inoculado/Implantado (n=45)	n=9	n=9	n=9	n=9	n=9

Após o implante/inoculação foram utilizados nove peixes de cada tratamento para a colheita da lamínula, músculo inoculado e órgãos (fígado, baço e rim) nos dias 3°, 7°, 14°, 21° e 33° para a análise histopatológica, imuno-histoquímica e lectino-histoquímica. No grupo controle foram coletados, fígado, baço, rim e músculo para análise histopatológica.

#### 4.3 Anestesia

Para o implante/inoculação, os peixes foram anestesiados por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção 1:10000 (v/v) para o implante da lamínula (WEDEMEYER, 1970; FERREIRA et al., 1979; MATUSHIMA, 1988). Para as coletas, os peixes foram eutanasiados mediante aprofundamento anestésico por imersão em solução aquosa de benzocaína na proporção 1:500 (v/v).

#### 4.4 Indução do processo inflamatório com BCG

O processo inflamatório foi induzido pela inoculação de 20 µL de vacina de BCG (40 mg/mL) (n° de bacilos vivos superior a  $2,0 \times 10^6$  UFC/mg de BCG Cepa Mureau Rio de Janeiro) na musculatura latero-caudal esquerda segundo a metodologia proposta por Matushima et al. (2005). Para estabelecer o volume a injetar, realizaram-se testes para saber qual foi o menor volume que induziu o processo inflamatório, injetaram-se: 5, 10, 20, 50 e 80 µL (40 mg/L) da vacina via intramuscular, depois de analisar o processo inflamatório com estes volumes injetados concluiu-se que 20 µL (40 mg/L) foi a quantidade adequada para induzir este processo.

#### 4.5 Implante da lamínula

Os peixes foram implantados com lamínulas de vidro arredondadas de 9 mm de diâmetro (Knittel-glass<sup>®</sup>) no tecido subcutâneo da região latero-dorsal, caudal ao opérculo esquerdo.

Após anestesia e assepsia do local, foi realizada uma incisão de aproximadamente um centímetro de comprimento com posterior divulsão do tecido subcutâneo para implante da lamínula (Figura 2). A incisão foi suturada e os peixes foram recolocados nas caixas (PETRIC et al., 2003).



Figura 2. Exemplar de *Piaractus mesopotamicus* implantado com lamínula..

Para análise da contagem de células, foram realizadas sob microscópio de luz em aumento total de 400x e capturadas as imagens (Câmera Olympus DP72 software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation<sup>®</sup>), sendo realizada a contagem de cinco campos por lamínula escolhidos ao acaso, totalizando 35 campos por tratamento por coleta.

#### 4.6 Colheita e fixação do material

As colheitas foram realizadas no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 33<sup>o</sup> dia pós-implante/inoculação. As lamínulas foram removidas e lavadas com solução salina a 0,65% para retirada da fibrina e posterior fixação em solução de Bouin durante uma

hora, lavadas várias vezes com álcool 70°. Logo se procedeu à coloração com hematoxilina de Harris durante 1 minuto, seguido da retirada do excesso de corante em água de torneira até sair a água limpa e passaram-se por três baterias de xilol-álcool para finalmente deixá-las em xilol puro. A montagem foi feita em lâminas com Entellan®.

#### **4.7 Colorações para análise histopatológica**

- a) Hematoxilina-Eosina (H.E.) – Os órgãos foram corados para observação de suas estruturas celulares gerais.
- b) Ziehl-Neelsen (Z.N.) – Com uso desta coloração, comprovou-se a presença do inóculo no tecido muscular.
- c) Perl's – Coloração especial para identificar hemossiderina (ferro).
- d) Schmorl's – Coloração especial para identificar lipofuscina e melanina.
- e) Azul de toluidina – Coloração especial para melhor detalhe dos limites dos CMMs para morfometria.

As lâminas montadas para análise do processo inflamatório no músculo foram observadas em microscópio de luz comum Olympus BX51 nos aumentos de 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes e registradas as fotomicrografias com câmera Olympus DP72 software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation®.

As contagens das células gigantes multinucleadas nas lamínulas implantadas foram realizadas em cinco campos aleatórios em aumento de 400x em cada uma (PETRIC et al., 2003) e fotografadas com Câmera Olympus DP72 software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation®.

Para analisar os CMMs, foram escolhidos aleatoriamente 5 campos em aumento 400x, fotografados (Câmera Olympus DP72 software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation®), contados e medidos ( $\mu\text{m}^2$ ).

#### **4.8 Análise imuno-histoquímica**

A padronização da técnica imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica da Universidad Santiago de Compostela – Espanha, sob orientação da Profa. Dra. Maria Isabel Quiroga Berdeal.

Testaram-se nove anticorpos para imunomarcção em material parafinado para células que participam do processo inflamatório: CD3 (Dako® IR 503/IS 503), lisozima (Dako® A 0099), S100 ab-2 (Neomarkers® RB-044-A0), Citoqueratina de largo espectro (WSS) (Dako® N1512), iNOS ab-1 (Neomarkers® RB-1065-P0), CD 57 (Biomeda® V6044), CD54 Ab-4 (Neomarkers®54C04), Anti-macrófago (Serotec® MCA 874 G. 1209) e MHC II (Dako TAL. 1B5 M0746)

Destes se utilizaram os que foram imunomarcção positiva (S-100, citoqueratina e iNOS).

Como anticorpo policlonal secundário foi utilizado o kit anti-coelho (Labellet® Polymer-HRP cód. K4011).

A técnica foi Em todos os testes de imuno-histoquímica as incubações foram realizadas em câmara úmida e em temperatura ambiente (23°C). Assim mesmo entre os diferentes passos do protocolo foram feitas três lavagens de 5 minutos cada com solução tampão fosfato salino (PBS pH 7,4).

Todos os cortes foram incubados com solução de bloqueio da peroxidase (Dako®, cód. S2023), durante 60 minutos para bloquear a proteína não específica.

A recuperação antigênica foi realizada após bloqueio da peroxidase endógena (Tabela 2).

Todos os cortes foram confeccionados em lâminas silanizadas, desparafinizadas em estufa a 60 °C, e hidratadas em soluções decrescentes de xilol três vezes, durante 10 minutos cada, seguidas de álcool 70, 80, 90 e 100% e lavagem final com água destilada por 5 minutos.

Para a anti-citoqueratina utilizou-se a diluição 1:500, a recuperação antigênica foi realizada pelo de calor sob pressão (panela de pressão) em tampão citrato 10 mM em pH 6,0 por 15 min.

Uma vez terminada a recuperação deixou-se esfriar, lavou-se três vezes por 5 minutos cada com PBS e posteriormente acrescentou-se o anticorpo primário permanecendo na câmara úmida durante 2 horas a temperatura ambiente (23°C). Seguido deste tempo lavou-se três vezes com PBS durante 5 minutos e colocou-se o anticorpo secundário anti-coelho para incubação na câmara úmida, durante 30 minutos, em temperatura ambiente (23°C).

Para a revelação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (1:200) (DAB, Dako<sup>®</sup>, EnVision + Sytem-HRP, cód. K4010-4011). O tempo de revelação foi de acordo com o anticorpo utilizado (Tabela 2). Para parar a reação deixou-se as lâminas em água destilada.

Para o controle positivo da anti-citoqueratina, anti-S100 e anti-iNOS utilizou-se pele de mamífero, sistema nervoso de mamífero e rim de peixe linguado (*Solea senegalensis*), respectivamente. Para o controle negativo optou-se por excluir o anticorpo primário da reação conservando os outros passos.

A contracoloração foi feita com hematoxilina de Harris por 15 segundos, com posterior lavagem em água corrente, seguida de desidratação em soluções crescentes de alcoóis e xilol, montados com DePex (Gurr<sup>®</sup> cód. 361254D) e observadas com microscópio de luz Olympus BX51 nos aumentos totais de 40, 100, 200, 400 e 1000 vezes.

Para a imunomarcção com S100 realizou-se o mesmo procedimento e para iNOS excluiu-se o passo da recuperação antigênica (Tabela 2).

Tabela 2. Condições para imunomarcção de cada anticorpo utilizado na marcação de células no granuloma induzido em *P. mesopotamicus* e *O. niloticus*.

Anticorpo primário	Recuperação antigênica	Diluição	Parâmetros de incubação	Tempo de revelado
Citoqueratina	Calor sob pressão com tampão Citrato 10 mM em pH 6,0 por 15 min.	1:500	2 horas temperatura ambiente	45 seg.
S100	Calor sob pressão com tampão Citrato 10 mM em pH 6,0 por 15 min.	1:400	2 horas temperatura ambiente	30 seg.
iNOS	Não	1:3000	2 horas temperatura ambiente	90 seg.

A avaliação histopatológica da lesão granulomatosa em HE e das imunomarcções foi realizada a partir da captura de imagens com câmera Olympus DP12 (software cellSens Standard 1.5 Olympus Corporation<sup>®</sup>) acoplada em microscópio de luz Olympus BX51.

Optou-se pela não imunomarcação do BCG porque foi comprovada a presença do inóculo mediante a coloração de ZN.

#### **4.9 Análise lectino-histoquímica**

Para o estudo da marcação com lectinas, depois da desparafinização e hidratação foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+metanol (3%), durante 30 minutos. Após este procedimento foi realizada a “recuperação antigênica” em “steamer”, durante 40 min., em solução de citrato, pH 6.0. O bloqueio das uniões inespecíficas mediante incubação com bloqueio da proteína (Protein block DAKO) durante uma hora seguido da incubação com cada uma das lectinas WGA (wheat germ agglutinin) (Lectin Kit I Biotinylated BK-1000, Vector Laboratories, Inc®), DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin) e HPA (*Helix pomatia* agglutinin) (E.Y. Laboratories Inc). Todas as lectinas foram diluídas 1:400 v/v e incubadas em câmara úmida durante 14 horas a 23 °C (Tabela 3). Secou-se e procedeu-se a incubação com estreptavidina-peroxidase, por 30 minutos, a 33 °C, seguido da revelação com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), durante 3 minutos, hidratação e contracoloração com hematoxilina de Harris para montagem. Para controle da marcação, excluiu-se a lectina. Entre cada passo as lâminas foram lavadas em PBS, pH 7.4 três vezes de 5 min. cada.

O exame foi realizado em microscópio Olympus BX51 e a captura de imagens com câmera digital (Olympus DP72 software cellSens Standard v. 1.5 Olympus Corporation®).

Tabela 3. Condições para marcação das lectinas utilizadas para marcação de células no granuloma induzido em *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*.

Lectina	Recuperação de carboidratos	Diluição	Parâmetros de incubação	Tempo de revelado
WGA	Em Steamer por 40 min. em tampão citrato pH 6.0.	1:400	14 horas a 20 °C	3 min
DBA	Em Steamer por 40 min. em tampão citrato pH 6.0.	1:400	14 horas a 20 °C	3 min
HPA	Em Steamer por 40 min. em tampão citrato pH 6.0.	1:400	14 horas a 20 °C	3 min

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros físico-químicos da água permaneceram constantes e proporcionaram conforto para os peixes de acordo com Ayroza e Scorvo (2011) (OD = 5,1 mg/L, T= 29,47 °C, pH=7,66 e condutividade elétrica = 117,96 µS/cm).

### 5.1. Avaliação do processo inflamatório em *Piaractus mesopotamicus* e *Oreochromis niloticus*

#### 5.1.1 Grupo Inoculado

Na avaliação dos cortes histológicos do pacu e tilápia-do-nilo observou-se o desenvolvimento do processo inflamatório referente à dinâmica celular, atividade fagocítica e aspectos teciduais gerais ocorridos em cada tempo sendo semelhante entre os dois, optando em realizar a descrição só do *P. mesopotamicus*.

Inicialmente foi comprovado o inóculo do BCG por meio da coloração de Ziehl-Neelsen. Observou-se em meio à reação inflamatória 14 dias após o inóculo de BCG a presença de bacilos álcool-ácido resistentes (Figura 3). Nesta observou-se o inóculo no centro do granuloma, circundado de macrófagos, alguns com bacilos fagocitados, e presença de tecido conectivo além de bacilos livres.

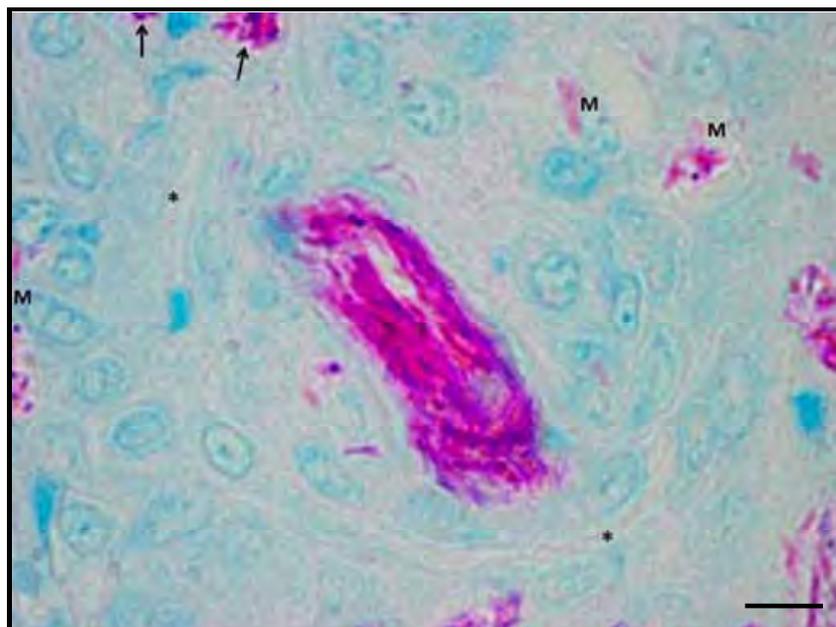


Figura 3. Fotomicrografia do músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se o centro do inoculo de BCG (I), macrófagos com conteúdo fagocitado (M), tecido conectivo (\*) e bacilos (setas) (ZN). Barra = 6  $\mu$ m.

Após o terceiro dia da indução do processo inflamatório com BCG o tecido muscular apresentou reação inflamatória com disposição difusa, predomínio de células mononucleares com cromatina densa e citoplasma reduzido. Havia células gigantes multinucleadas em atividade fagocítica e plasmócitos. Evidenciou-se edema intersticial caracterizado pela dissociação das fibras musculares, presença de material inoculado e poucos pigmentos que podem ser associados à destruição de hemácias fagocitados pelos macrófagos livres (melanomacrófagos) (Figuras 4, 5, 6, 7).

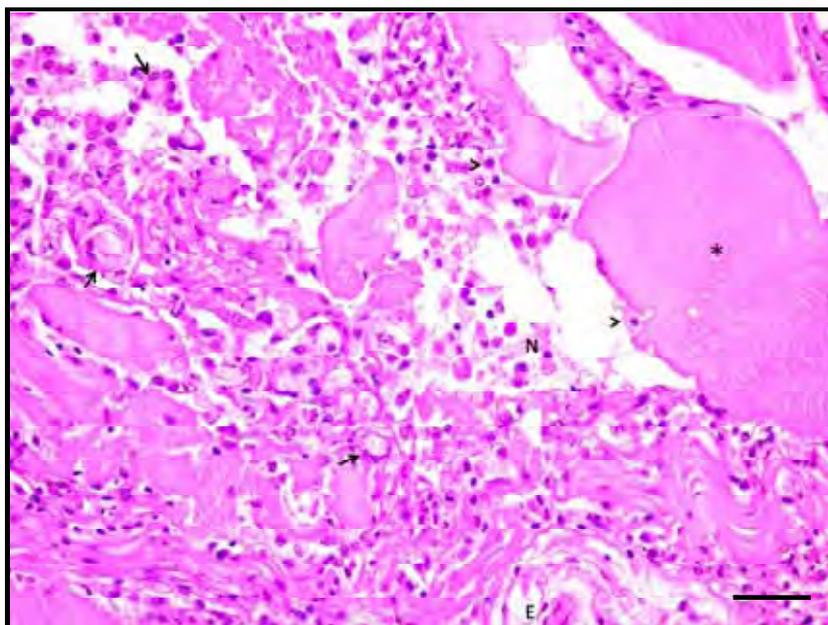


Figura 4. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 3 dias após a inoculação do BCG. Observam-se células gigantes multinucleadas com conteúdo fagocitado (seta), necrose tecidual (N), edema intersticial (E), fibras musculares (\*) e plasmócito (ponta da seta) (HE). Barra = 30  $\mu$ m.

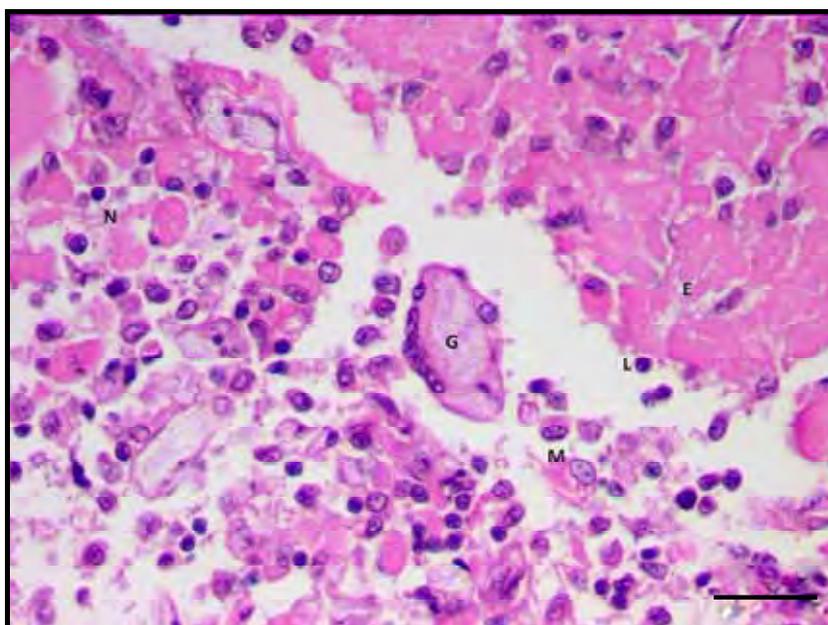


Figura 5. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 3 dias após a inoculação do BCG. Observa-se células gigantes multinucleadas com conteúdo fagocitado (G), necrose tecidual (N), edema intersticial (E), e macrófagos com material fagocitado (grupos de BCG) (M) (HE). Barra = 20  $\mu$ m.

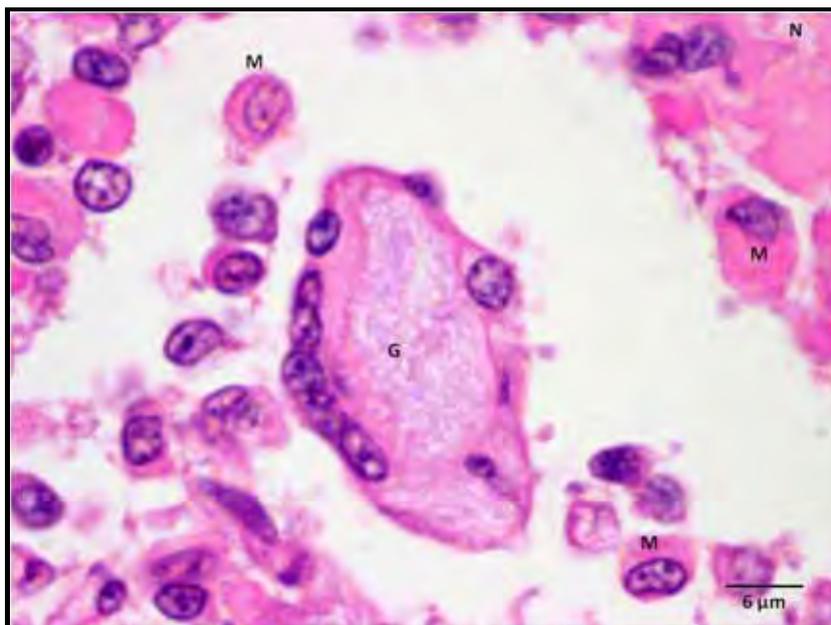


Figura 6. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 3 dias após a inoculação do BCG. Observa-se em detalhe uma célula gigante com os núcleos dispostos na periferia celular (tipo Langhans), macrófagos com núcleo e nucléolos evidentes (M) e necrose tecidual (N) (HE). Barra = 6 μm.

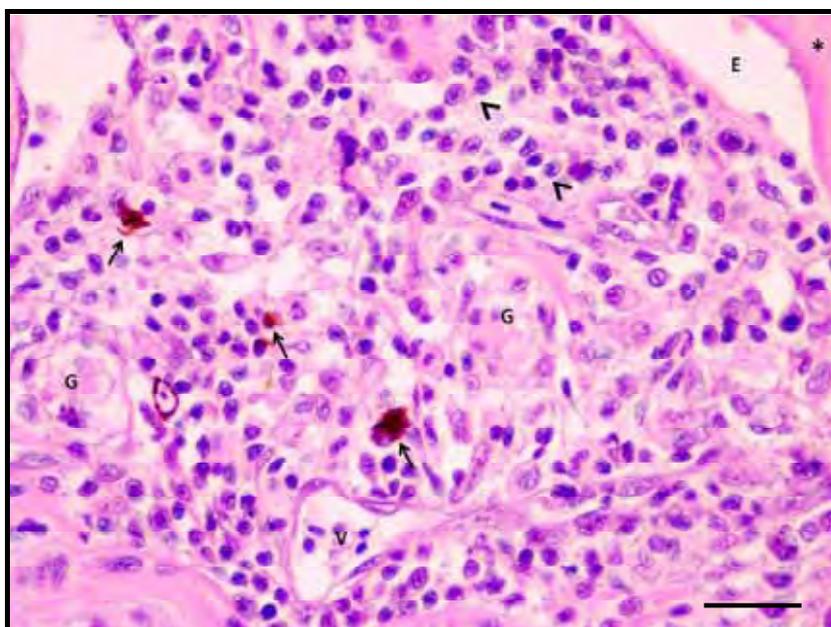


Figura 7. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 3 dias após a inoculação do BCG. Melanomacrófagos (seta), edema (E), desarranjo das fibras musculares (\*), macrófago (ponta da seta), vaso sanguíneo (v) e célula gigante multinucleada (G) (HE). Barra = 20 μm.

Decorridos sete dias da inoculação a reação inflamatória continuou difusa, com início da organização celular ao redor do inóculo em forma de granulomas. Observou-se infiltrado mononuclear e maior formação de células gigantes multinucleadas, persistência de edema intersticial e necrose tecidual. As células gigantes multinucleadas apresentaram vários núcleos e amplo citoplasma, nota-se presença de plasmócitos e focos hemorrágicos. Os vasos sanguíneos apresentaram células mononucleares marginadas à corrente axial sanguínea. Os focos de infiltrado celular perivascular por células que contém núcleos de cromatina densa e pouco citoplasma. No infiltrado celular inflamatório evidenciou-se grânulos de cor castanha compatíveis com hemossiderina derivada de hemorragia. Ao redor do inoculo evidenciou-se células com aparência de fibrócitos (Figuras 8, 9, 10).

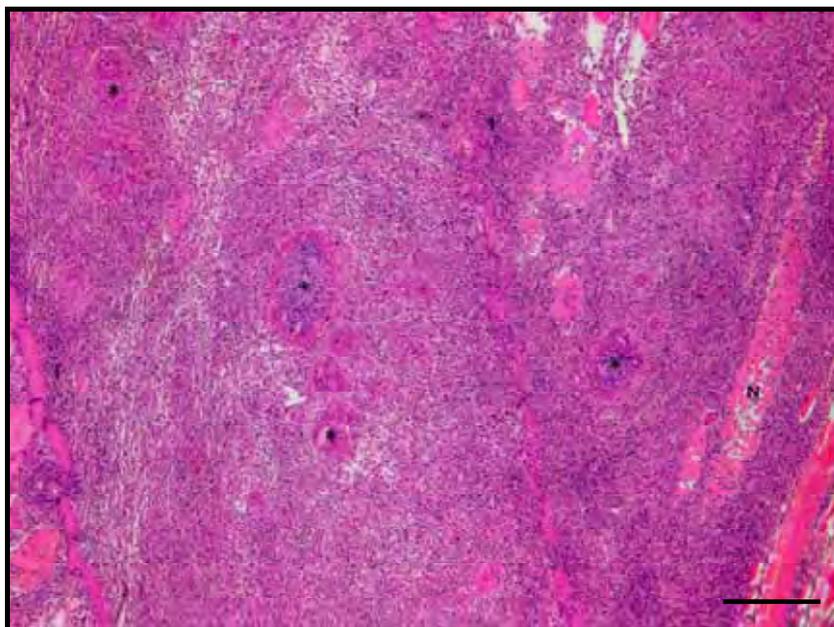


Figura 8. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 7 dias após a inoculação do BCG. Melanomacrófagos (seta), edema (E), desarranjo das fibras musculares (\*), Infiltrado mononuclear (I) macrófago (ponta da seta) e célula gigante multinucleada (G) (HE). Barra = 20  $\mu$ m.

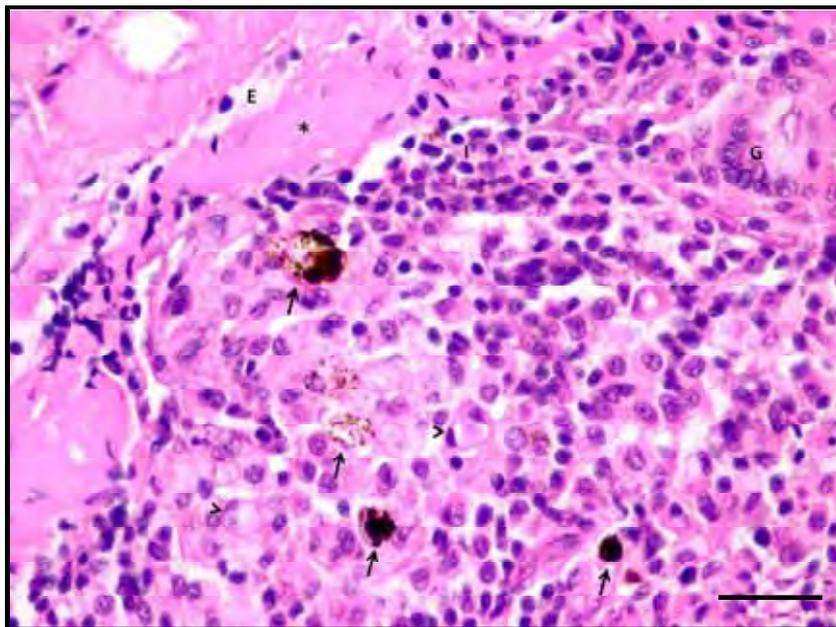


Figura 9. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 7 dias após a inoculação do BCG. Observam-se melanomacrófagos (seta), célula gigante multinucleada (G), edema (E), macrófago (cabeça de seta), músculo (\*) e infiltrado mononuclear (I) (HE). Barra = 20  $\mu$ m.

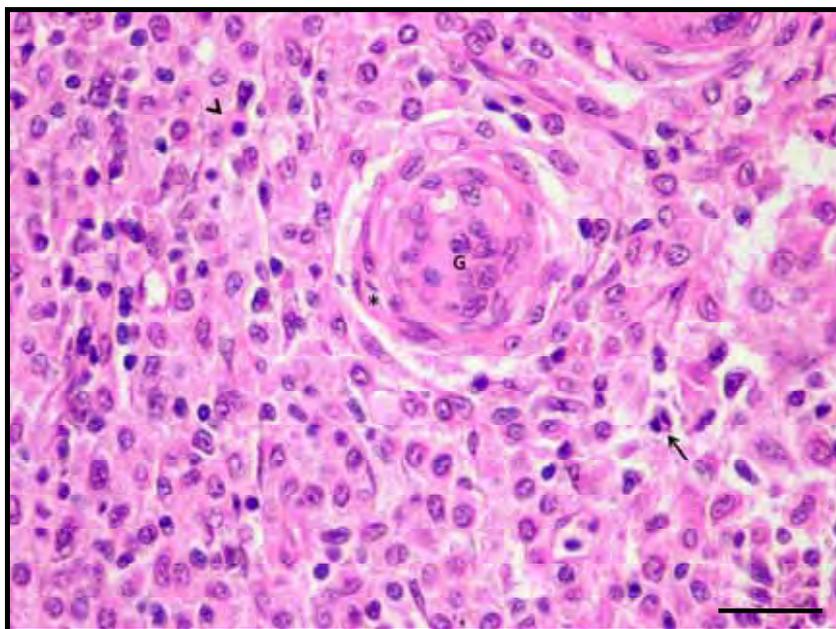


Figura 10. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 7 dias após a inoculação do BCG. Observa-se o início da formação do granuloma com macrófagos (G), presença de células fibroblásticas (\*), plasmócitos (ponta da seta) e célula em mitose (seta) (HE). Barra = 20  $\mu$ m.

Após do décimo quarto dia da inoculação do BCG, não ocorreu edema intersticial e teve discreta presença de células gigantes multinucleadas, os focos de necrose continuam presentes, mas em menor intensidade, o foco inflamatório apresentou-se mais organizado com presença de infiltrado mononuclear, restos de pigmentos com características de hemossiderina livres indicando a destruição de hemácias e fibroblastos dispostos ao redor do granuloma. Neste observou-se morfologia típica do granuloma com inóculo central seguido de células mononucleares na região periférica. Pode-se notar que houve uma formação discreta células epitelióides com citoplasma acidófilo e cromatina frouxa. (Figuras 11, 12, 13).

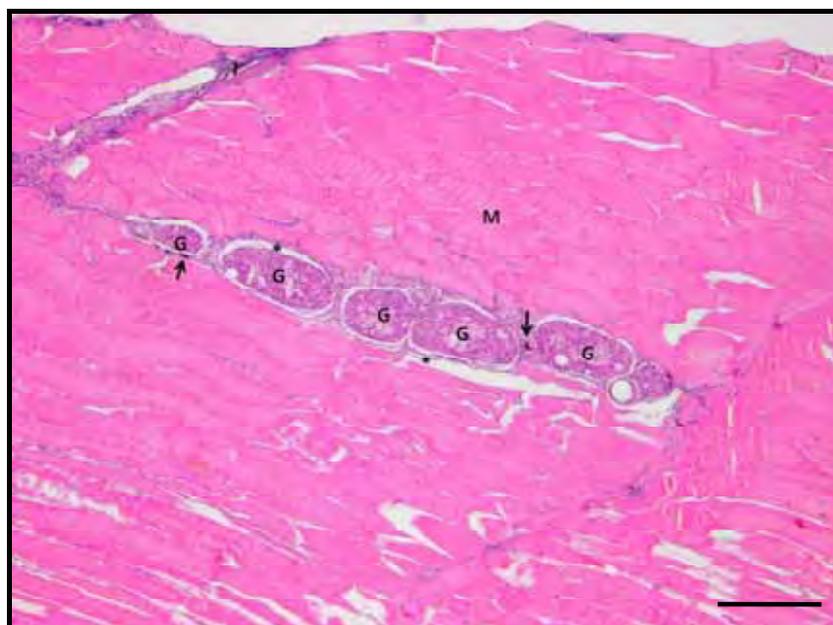


Figura 11. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observou-se a disposição dos granulomas (G) com presença de fibroblastos ao redor (\*), infiltrado mononuclear (I), músculo esquelético (M) e melanomacrófagos (seta) (HE). Barra = 200  $\mu$ m.

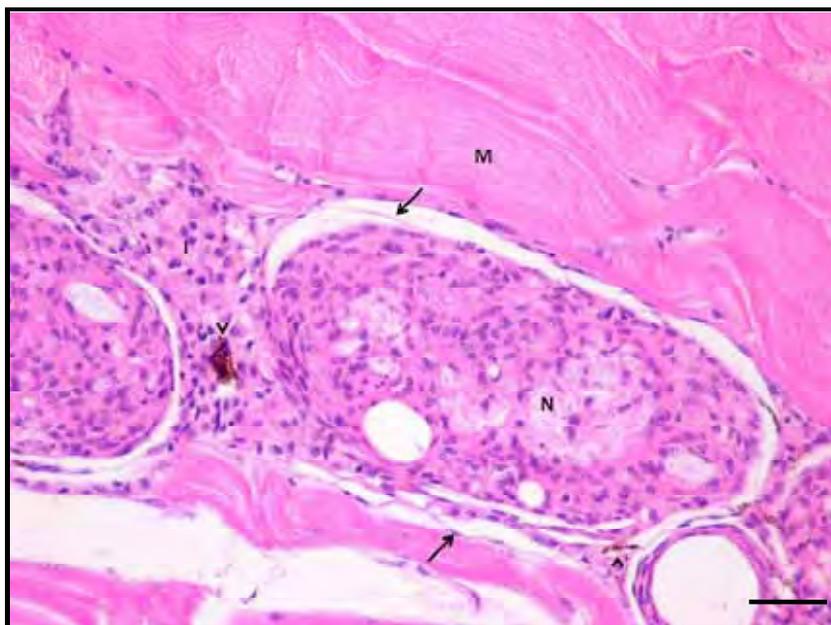


Figura 12. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observou-se a formação do granuloma com necrose central (N), presença fibroblastos ao redor (seta), infiltrado mononuclear (I), músculo esquelético (M) e melanomacrófago (cabeça de seta) (HE). Barra = 30  $\mu$ m.

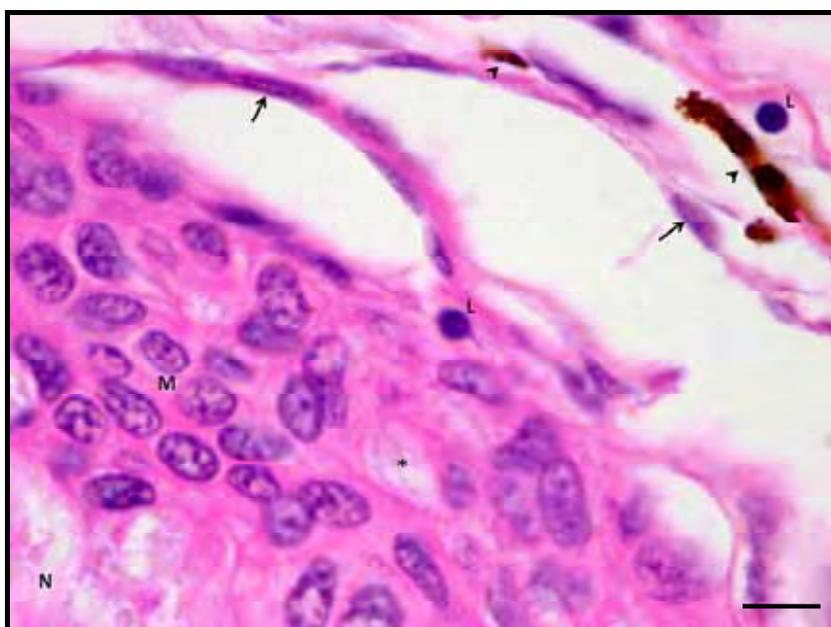


Figura 13. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 14 dias após a inoculação do BCG. Observa-se a formação do granuloma com o inóculo (N), macrófagos (com núcleo e nucléolo) (M), células epitelióides (\*), linfócito (L), fibroblastos (seta), hemossiderina (ponta da seta) (HE). Barra = 6  $\mu$ m.

Após o vigésimo primeiro dia da inoculação do BCG no músculo, ocorreu edema intersticial discreto com poucos pontos de necrose tecidual. Observou-se intenso infiltrado inflamatório mononuclear. Ao redor do tecido granulomatoso aumentou a quantidade de fibroblastos e presença de células com características de macrófagos (Figuras 14, 15, 16).

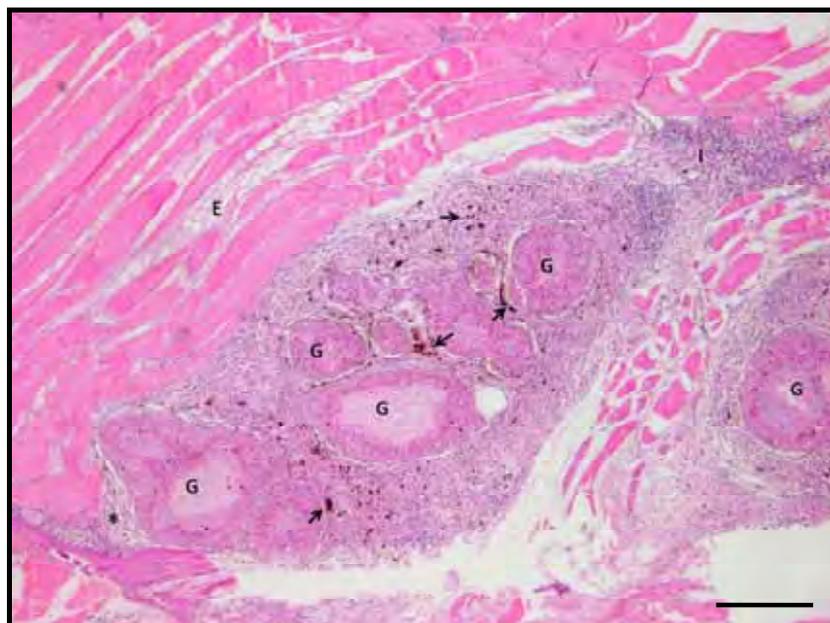


Figura 14. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observou-se os granulomas (G), edema intersticial (E), infiltrado mononuclear (I), pigmentação associada à presença de melanomacrófagos (seta) (HE). Barra = 200  $\mu$ m.

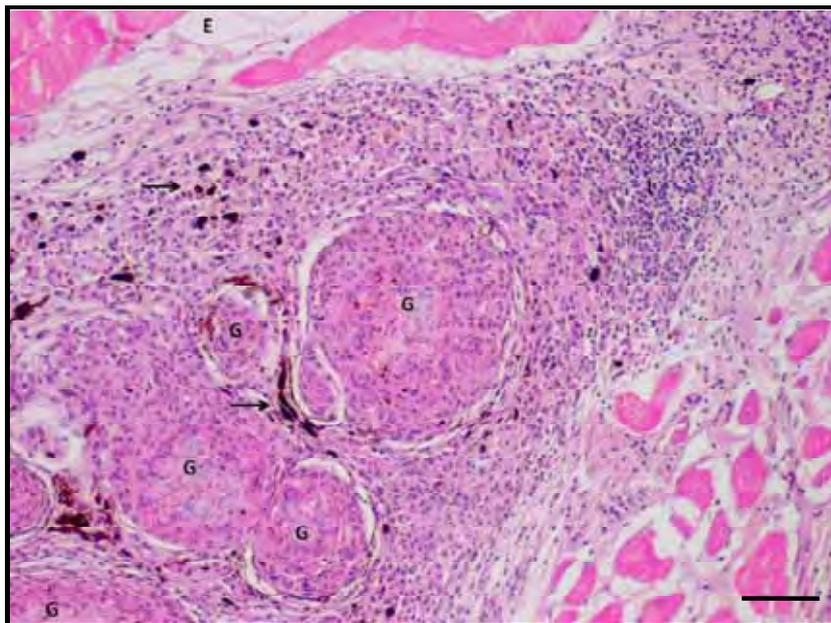


Figura 15. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observou-se os granulomas (G), edema intersticial (E), infiltrado mononuclear (I), pigmentação associada à presença de hemácias (seta) (HE). Barra = 60  $\mu$ m.

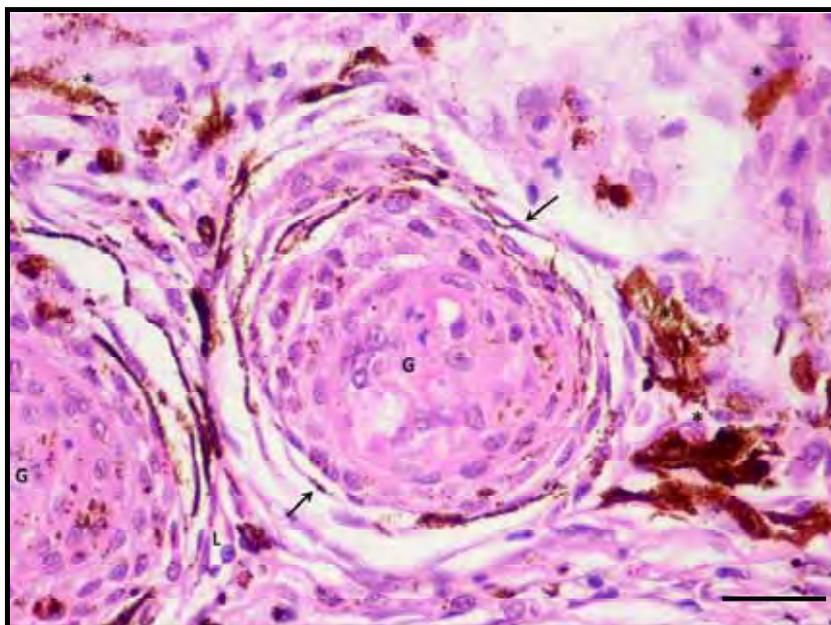


Figura 16. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 21 dias após a inoculação do BCG. Observou-se granulomas (G) com fibroblastos (seta) e hemossiderina (\*) (HE). Barra = 20  $\mu$ m.

Depois do trigésimo terceiro dia da inoculação da inflamação com o BCG, as características não diferiram muito em relação ao 21<sup>o</sup> dia. A

inflamação continuou com padrão difuso, presença de poucos pontos de necrose. Observou-se infiltrado inflamatório mononuclear e formação de granulomas pequenos, circundados pelo mesmo tipo de reação, ou seja, contidos em um granuloma maior. Os granulomas pequenos assim como os maiores apresentaram a constituição característica havendo ao redor do inóculo uma camada de células epitelióides, seguidas por outra de macrófagos que também tinham poucos linfócitos e uma cápsula conjuntiva. Nesta cápsula e mais externamente notan-se linfócitos (Figuras 17, 18, 19).

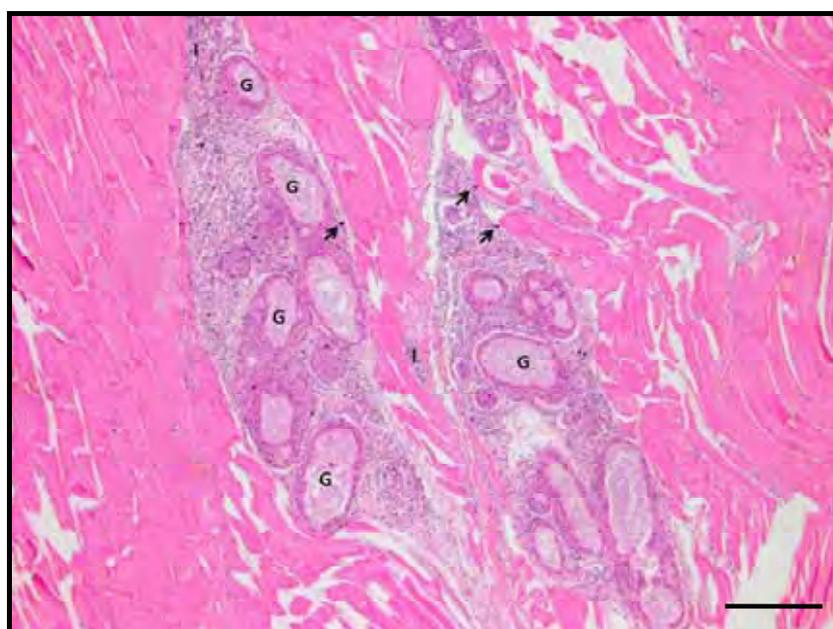


Figura 17. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observou-se granulomas (G) formando um único granuloma, infiltrado mononuclear (I) e hemossiderina (seta) (HE). Barra = 200  $\mu$ m.

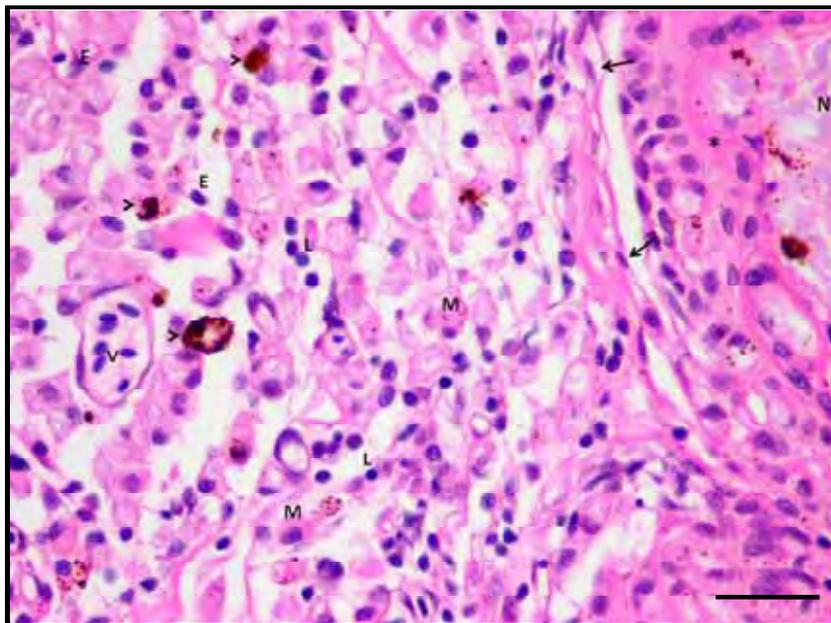


Figura 18. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observou-se a necrose central do granuloma (N), fibras colágenas (\*), fibroblastos (seta), macrófago (M), melanomacrófago (cabeça de seta), linfócito (L), eritrócito (E) e vaso sanguíneo (V) (HE). Barra = 20  $\mu\text{m}$ .

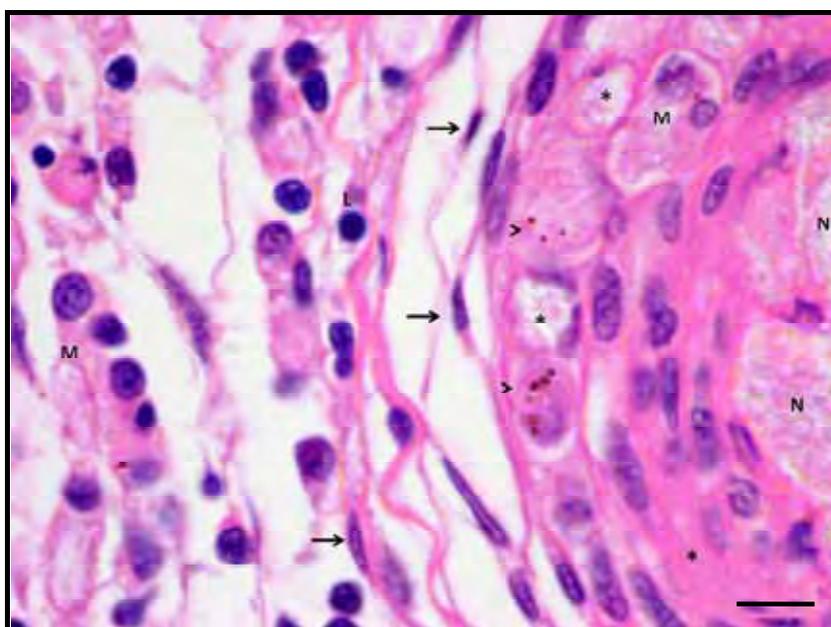


Figura 19. Fotomicrografia de músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observou-se o inóculo no centro do granuloma (N), células epitelióides (\*), fibroblastos rodeando a camada de macrófagos (seta), macrófagos (M) e melanomacrófagos (cabeça de seta). (HE). Barra = 6  $\mu\text{m}$ .

Neste estudo a inflamação se iniciou com intensa reação perivascular principalmente por macrófagos que migraram para a área lesada, eventos também observados por Nash et al. (1986), Matushima (1994) e Sado e Matushima (2007, 2008). Com o passar do tempo formam-se células gigantes multinucleadas como também descrito por Goodwin e Grizzle (1991), Pulsford e Matthews (1991), Gómez (1998), Talaat et al. (1999), Matushima (1994) e Howard e Byrd (2000). Todavia Ishikawa (1998) não observou gigantócitos após 84 dias da inoculação de *Mycobacterium marinum* em *O. niloticus*. Esta diferença pode, pelo menos em parte, ser atribuída às diferentes espécies de micobactéria utilizadas.

Células epitelióides também foram observadas por Brito e Franco (1994), Huizinga e Nadakavukaren (1997), Gómez (1998), Talaat et al. (1999), assim como Howard e Byrd (2000). O alto número de melanomacrófagos como observado neste trabalho provavelmente foi devido à hemorragia presente na lesão muscular, em que estas células fagocitaram a hemossiderina resultante da lise dos eritrócitos como observado também por, Matushima (1994), Noga (1996), Chinabut (1999) Rego (1999) e Ramos (2000).

No 33º dia de inflamação a formação dos granulomas foi bem evidente, com organização de macrófagos dispostos ao redor do inóculo, células epitelióides e gigantócitos tipo corpo estranho, anteriormente observados por Sado e Matushima (2007). Porém, não houve formação de centro caseoso ao contrário do observado por Romano et al. (2012) em que os autores observaram a necrose caseosa em *Paralichthys orbignyanus* e *Elacatinus figaro* naturalmente infectados por *M. marinum*.

As características de coloração celular nos granulomas ora observados evoluíram conforme o descrito por Gauthier et al. (2003), onde macrófagos com atividade fagocítica sofreram modificações morfofisiológicas e se transformaram em células epitelióides com atividade secretora. Estas manterão o granuloma conforme descrito por Mariano (1995) para granulomas do tipo imune.

## 5.2 Avaliação do implante de lamínulas em *O. niloticus* e *P. mesopotamicus*

As CGM formadas foram contadas “*in totum*”, assim como o número de núcleos por cada CGM tipo corpo estranho (Figura 20) e o número de células gigante multinucleada tipo Langhans (Figura 21) para estabelecer a correlação entre eles.

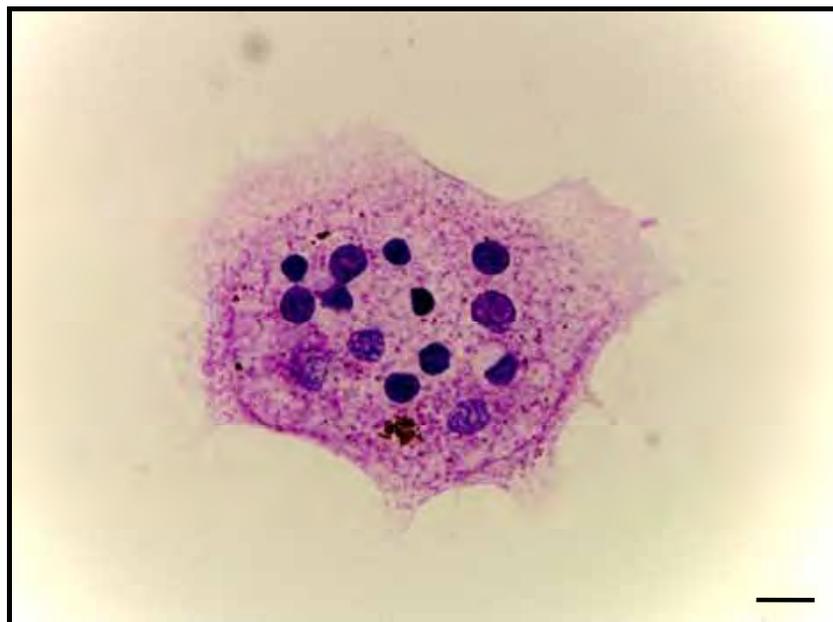


Figura 20. Fotomicrografia de célula gigante multinucleada tipo corpo estranho em lamínula implantada. Sétimo dia após o implante em *Piaractus mesopotamicus*. Hematoxilina de Harris. Barra = 10  $\mu$ m.

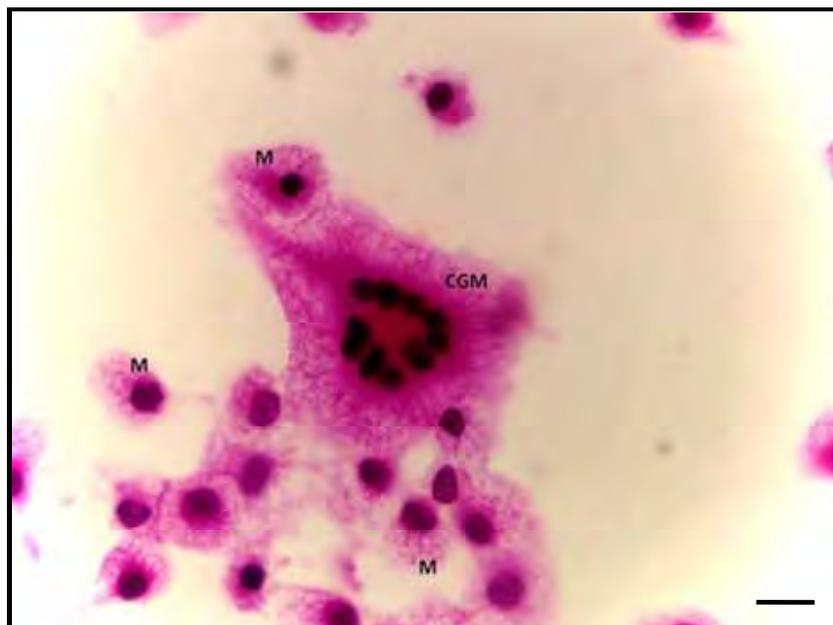


Figura 21. Fotomicrografia de célula gigante multinucleada tipo Langhans (CGM) e macrófagos (M). Trigésimo terceiro dia após o implante em *Piaractus mesopotamicus*. Hematoxilina de Harris. Barra = 10  $\mu$ m.

Na análise de acúmulo de macrófagos nas lamínulas implantadas em *O. niloticus* (Tabela 4) não se observou diferença estatística na resposta celular entre os tratamentos (IMP e IMP BCG) para cada dia de coleta, com exceção do primeiro dia, no qual o tratamento IMP apresentou maior número de macrófagos com um núcleo.

Analisando cada tratamento por número de núcleos, observou-se que no IMP e IMP BCG, o acúmulo de macrófagos com um núcleo foi significativamente maior quando comparado com os outros tratamentos em diferentes dias. Cada um dos tratamentos em todos os tempos de coletas na contagem de 2, 3 a 5, 6 a 10, mais de 20 núcleos e células de Langhans não apresentaram diferença estatística. Na contagem de 11 a 20 núcleos o tratamento IMP do dia 14 foi diferente ao IMP do dia 33. Os outros foram estatisticamente iguais quando comparados entre si.

Tabela 4. Valores médios<sup>(1)</sup> transformados em log (x+1), e resultado da análise de variância<sup>(2)</sup> das contagens de células nas lamínulas coletas no 3º, 7º, 14º, 21º e 33º dia após os estímulos no *Oreochromis niloticus*, submetidas aos tratamentos implante e implante/inóculo.

Coleta (dias)	Tratamento	Número de núcleos							Cél. Lang. <sup>(3)</sup>
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	> 20		
3	IMP	2,60 <sup>Aa</sup>	1,78 <sup>Aa</sup>	-	-	-	-	-	-
	IMP BCG	2,09 <sup>Bb</sup>	1,64 <sup>Aa</sup>	-	-	-	-	-	-
7	IMP	2,59 <sup>Aa</sup>	1,98 <sup>Aa</sup>	-	-	-	-	-	-
	IMP BCG	2,62 <sup>Aa</sup>	1,83 <sup>Aa</sup>	-	-	-	-	-	-
14	IMP	2,62 <sup>Aa</sup>	1,81 <sup>Aa</sup>	1,54 <sup>Aa</sup>	1,45 <sup>Aa</sup>	1,08 <sup>Ba</sup>	1,07 <sup>Aa</sup>	1,07 <sup>Aa</sup>	
	IMP BCG	2,73 <sup>Aa</sup>	1,97 <sup>Aa</sup>	1,39 <sup>Aa</sup>	1,39 <sup>Aa</sup>	1,10 <sup>Ba</sup>	1,07 <sup>Aa</sup>	1,07 <sup>Aa</sup>	
21	IMP	2,77 <sup>Aa</sup>	1,75 <sup>Aa</sup>	1,50 <sup>Aa</sup>	1,44 <sup>Aa</sup>	1,37 <sup>ABa</sup>	1,14 <sup>Aa</sup>	1,14 <sup>Aa</sup>	
	IMP BCG	2,93 <sup>Aa</sup>	2,00 <sup>Aa</sup>	1,55 <sup>Aa</sup>	1,53 <sup>Aa</sup>	1,15 <sup>Ba</sup>	1,18 <sup>Aa</sup>	1,18 <sup>Aa</sup>	
33	IMP	2,66 <sup>Aa</sup>	1,73 <sup>Aa</sup>	1,50 <sup>Aa</sup>	1,54 <sup>Aa</sup>	1,44 <sup>Aa</sup>	1,16 <sup>Aa</sup>	1,16 <sup>Aa</sup>	
	IMP BCG	2,68 <sup>Aa</sup>	1,79 <sup>Aa</sup>	1,52 <sup>Aa</sup>	1,52 <sup>Aa</sup>	1,32 <sup>ABa</sup>	1,03 <sup>Aa</sup>	1,04 <sup>Aa</sup>	
Valor de F Tratamento		0,39	0,40	0,40	2,53	0,40	2,53	0,40	
Pr>F <sup>(4)</sup>		0,53	0,52	0,52	0,11	0,52	0,11	0,52	
Valor de F Tempo		0,01	2,82	2,82	7,83	2,82	7,83	6,37	
Pr>F <sup>(4)</sup>		0,98	0,04	0,04	<0,0001	0,04	<0,0001	<0,0001	
Valor de F Interação		0,11	0,26	0,26	0,97	0,26	0,97	3,56	
Pr>F <sup>(4)</sup>		0,89	0,76	0,76	0,42	0,76	0,42	0,007	

IMP=implante; IMP+BCG= implante associado ao inóculo de BCG; BCG=inóculo de 20 µL de BCG (40 mg/mL). <sup>(1)</sup> Média aritmética de 90 contagens por dia (2 tratamentos x 9 animais por tratamento x 5 campos lamínula). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna entre tratamentos e diferente dia e em minúsculas diferentes na coluna entre tratamentos no mesmo dia são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (P < 0,05). <sup>(2)</sup> Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias de coleta estudados. <sup>(3)</sup> Células de Langhans. <sup>(4)</sup> Pr>F Probabilidade de significância de F para tratamento, tempo e sua interação.

Na avaliação do acúmulo celular classificado pelo número de núcleos por célula e pelo número de células de Langhans em *P. mesopotamicus* (Tabela 5) não se observou diferença estatística entre os tratamentos, no mesmo dia, para a contagem de cada grupo de núcleos. As células de Langhans foram observadas nas duas espécies onde, para *O. niloticus*, no 14º dia não foi observada diferença estatística entre os tratamentos do mesmo nem entre estes. Para *P. mesopotamicus* a formação destas células ocorreu no 21º dia e no *O. niloticus* no 14º dia.

Quando analisado entre tratamentos em todas as coletas para células com um núcleo, observou-se diferença estatisticamente maior nos tratamentos 14, 21 e 33, para as células com 2 núcleos o tratamento IMP 3 foi estatisticamente menor com relação aos outros e igual aos tratamentos IMP 7, IMP BCG 7, IMP BCG 21 e IMP, IMP BCG 33.

O comportamento da cinética de acúmulo de macrófagos foi semelhante ao de *O. niloticus*. Onde os diferentes tratamentos apresentam diferença estatística quanto ao número de macrófagos de um núcleo e de 11 a 20 núcleos. Neste último o tratamento IMP e IMP BCG do dia 33 foi estatisticamente maior que os outros tratamentos, com exceção do IMP 14.

Tabela 5. Valores médios<sup>(1)</sup> transformados em log (x+1), e resultado da análise de variância<sup>(2)</sup> das contagens de células nas lamínulas coletas no 3º, 7º, 14º, 21º e 33º dia após os estímulos no *Piaractus mesopotamicus*, submetidas aos tratamentos implante e implante/inóculo.

Coleta (dias)	Tratamento	Número de núcleos							Cél. Lang. <sup>(3)</sup>
		1	2	3 a 5	6 a 10	11 a 20	> 20		
3	IMP	2,33 <sup>Da</sup>	1,26 <sup>Ba</sup>	-	-	-	-	-	-
	IMP BCG	2,44 <sup>CDa</sup>	1,51 <sup>Aa</sup>	-	-	-	-	-	-
7	IMP	2,73 <sup>ABCa</sup>	1,44 <sup>ABa</sup>	-	-	-	-	-	-
	IMP BCG	2,55 <sup>BCDa</sup>	1,41 <sup>Ba</sup>	-	-	-	-	-	-
14	IMP	2,83 <sup>ABa</sup>	1,97 <sup>Aa</sup>	1,51 <sup>Aa</sup>	1,48 <sup>Aa</sup>	1,10 <sup>ABCa</sup>	-	-	-
	IMP BCG	2,76 <sup>ABCa</sup>	1,89 <sup>Aa</sup>	0,82 <sup>Aa</sup>	1,41 <sup>Aa</sup>	1,02 <sup>Ca</sup>	-	-	-
21	IMP	2,73 <sup>ABCa</sup>	1,92 <sup>Aa</sup>	1,66 <sup>Aa</sup>	1,48 <sup>Aa</sup>	1,06 <sup>BCa</sup>	1,29 <sup>Aa</sup>	1,12 <sup>Aa</sup>	-
	IMP BCG	2,87 <sup>ABa</sup>	1,70 <sup>ABa</sup>	1,57 <sup>Aa</sup>	1,42 <sup>Aa</sup>	1,09 <sup>BCa</sup>	1,26 <sup>Aa</sup>	1,09 <sup>Aa</sup>	-
33	IMP	2,71 <sup>ABCa</sup>	1,79 <sup>ABa</sup>	1,50 <sup>Aa</sup>	1,44 <sup>Aa</sup>	1,46 <sup>Aa</sup>	1,19 <sup>Aa</sup>	1,11 <sup>Aa</sup>	-
	IMP BCG	2,97 <sup>Aa</sup>	1,82 <sup>ABa</sup>	1,53 <sup>Aa</sup>	1,44 <sup>Aa</sup>	1,41 <sup>ABa</sup>	1,17 <sup>Aa</sup>	1,10 <sup>Aa</sup>	-
Valor de F Tratamento		0,88	2,53	0,40	0,40	0,46	0,39	2,53	-
Pr>F <sup>(4)</sup>		0,34	0,11	0,52	0,52	0,50	0,53	0,11	-
Valor de F Tempo		9,27	7,83	2,82	2,82	11,90	0,01	7,83	-
Pr>F <sup>(4)</sup>		<,0001	<,0001	0,04	0,04	<,0001	0,98	<,0001	-
Valor de F Interação		1,97	0,97	0,26	0,26	0,19	0,11	0,97	-
Pr>F <sup>(4)</sup>		0,09	0,42	0,76	0,76	0,82	0,89	0,42	-

IMP=implante; IMP+BCG= implante associado ao inóculo de BCG; BCG=inóculo de 20 µL de BCG (40 mg/mL). <sup>(1)</sup> Média aritmética de 90 contagens por dia (2 tratamentos x 9 animais por tratamento x 5 campos lamínula). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna entre tratamentos e diferente dia e em minúsculas diferentes na coluna entre tratamentos no mesmo dia são estatisticamente diferentes pelo Teste de Tukey (P < 0,05). <sup>(2)</sup> Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias de coleta estudados. <sup>(3)</sup> Células de Langhans. <sup>(4)</sup> Pr>F Probabilidade de significância de F para tratamento, tempo e sua interação.

Vários autores descreveram a formação de células gigantes multinucleadas em processos inflamatórios crônicos, principalmente granulomatosos em peixes, como Miyazaki e Kaige (1985) na infecção por *Edwardsiella tarda* em *O. niloticus*; Timur e Tirmur (1984) por *Ichthyophonus hoferi* em *Pleurectes platessa*; Puslford e Matheus (1991) por *Mycrosporidium* sp. em *Trisopterus esmarkii*; Matushima et al. (2006) por BCG em *O. niloticus*, assim como Sado e Matushima (2008) em *Arius genus*.

Na avaliação da formação de células gigantes multinucleadas nas lamínulas implantadas nos tratamentos ao longo do tempo não apresentaram diferença estatística, exceto em alguns tempos. Com estes resultados entre *O. niloticus* e *P. mesopotamicus*, infere-se que ambas as espécies responderam de forma semelhante tanto ao estímulo imune como ao não imune e à associação de ambos na cinética do acúmulo de macrófagos e na formação de células de Langhans nas condições deste estudo.

O surgimento de células gigantes multinucleadas durante o processo inflamatório crônico no presente trabalho, também foi observado por Petric et al. (2003) e Belo et al. (2005). Sua maturação para células Langhans ocorreu no 14º dia e corrobora o observado por Belo et al. (2012), mas não o observado por Petric et al. (2003). Neste último as primeiras células de Langhans surgiram no 7º dia após o implante, enquanto no presente estudo estas apareceram no 33º dia em *P. mesopotamicus* e no 14º dia em *O. niloticus*, indicando resposta inespecífica mais rápida nesta última espécie. Esta diferença talvez possa ser atribuída ao metabolismo mais acelerado da tilápia-do-nilo em relação ao pacu nas condições deste ensaio.

Macrófagos (monócitos) são recrutados para o local de implante por via sanguínea em resposta a sinais de outras células inflamatórias tais como neutrófilos, e tornam-se ativados *in situ* sem conhecer se a natureza exata desses sinais. Uma hipótese indica que são propagados por quimiocinas, tais como ligante 2 (CCL2), conhecida como proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (GU et al., 1999).

A avaliação da cinética de acúmulo dos macrófagos induzida por várias respostas vem sendo cada dia mais estudada em implante de corpos estranhos. Anderson et al. (1999) e Defife et al. (1997) observaram que linfocinas regulam a fusão dos macrófagos e leva a variantes morfológicas de

células gigantes multinucleadas. Outros autores atribuíram que a formação destas células depende da composição do substrato do corpo estranho (KYRIAKIDES et al., 2004; MCNALLY e ANDERSON, 1995), assim como de fatores como temperatura (COLLIER et AL., 2002). Sabe-se que a formação de células gigantes dependem de interleucinas como IL-4 e IL-13 (BRODBECK e ANDERSON, 2009) assim como do interferon-gama (ANDERSON et al., 2008).

Embora o significado das células gigantes multinucleadas em processos inflamatórios crônicos não seja completamente conhecido, alguns estudos concluem que o aumento na formação destas, dependem da taxa de renovação dos macrófagos no granuloma (SPECTOR e RYAN, 1969). Com isto é possível inferir que a espécie *O. niloticus* reage mais rapidamente frente ao corpo estranho tipo lamínula que o *P. mesopotamicus*.

### **5.3 Avaliação dos centros de melanomacrófagos (CMMs)**

Na análise dos cortes histopatológicos, observou-se que o pacu não apresentou formação de CMMs como ocorreu na tilápia-do-nilo, inclusive no grupo controle (Figura 22).

Nos resultados da análise dos CMMs em *O niloticus*, uma vez realizadas as colorações observou-se que os CMMs continham hemossiderina, corada em azul e os núcleos dos macrófagos em vermelho (coloração de Perl's) (Figura 23), mas foram negativos para melanina e lipofuscina (coloração de Schmorl's) (Figura 24). Para contagem dos CMMs presentes no baço as lâminas foram coradas com azul de toluidina (Figura 25) e escolhidas as sete melhores lâminas (cada tratamento por coleta) em termos de integridade e coloração. Para a contagem dos CMMs, foram escolhidos cinco campos ao acaso para um total de 175 leituras por tratamento (5 coletas x 7 lâminas x 5 campos) no aumento total de 200x.

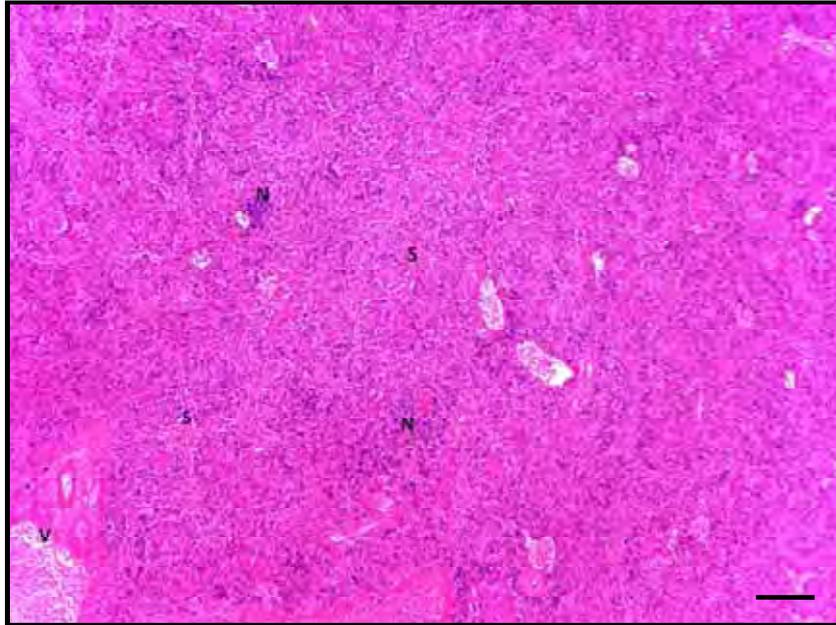


Figura 22. Fotomicrografia de baço de *Piaractus mesopotamicus* vinte e um dias após o implante e inóculo de BCG. Em detalhe vasos sanguíneos (V), nódulos linfóides (N) e sinusoides (S). Nota-se a ausência de centro de melanomacrófagos. (HE). Barra = 6  $\mu$ m.

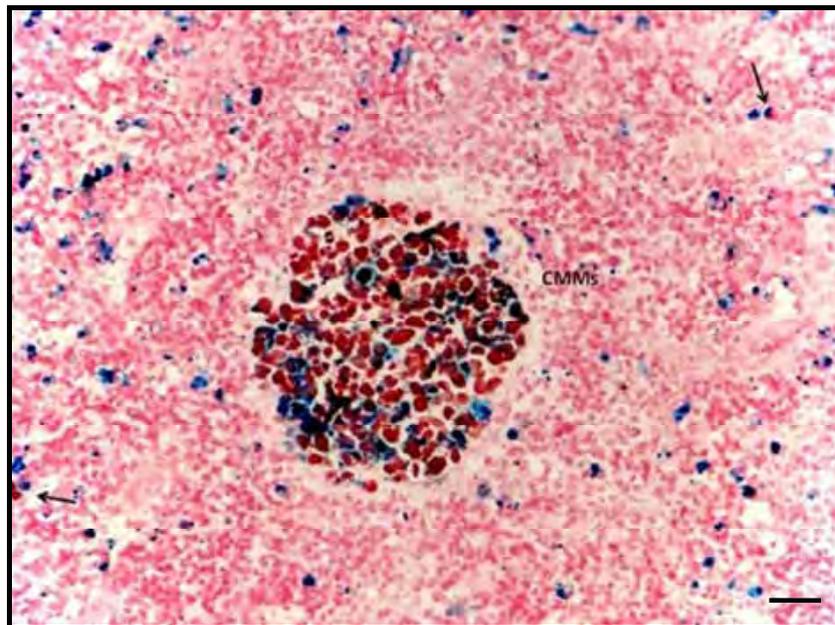


Figura 23. Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (seta) em *Oreochromis niloticus*. Grupo controle. (Perl's). Barra = 20  $\mu$ m.

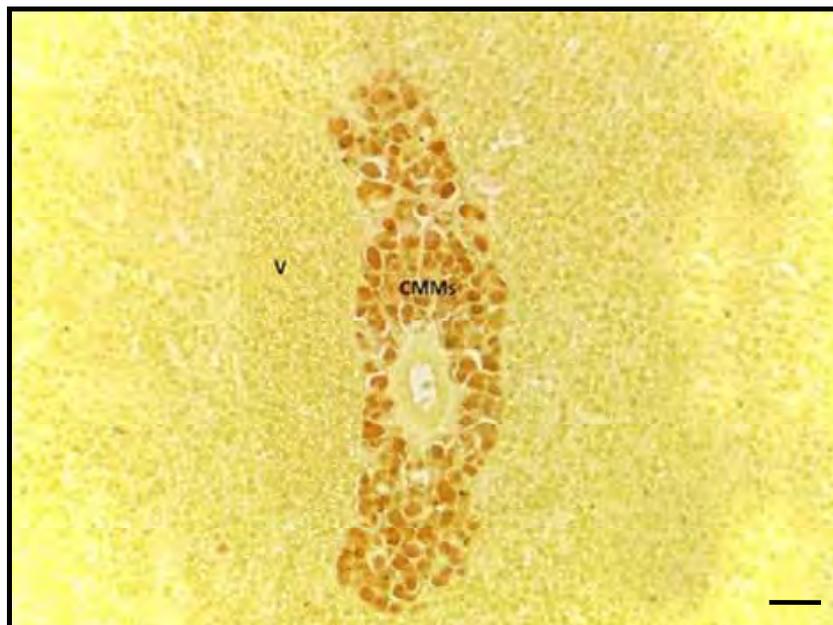


Figura 24. Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) em *Oreochromis niloticus*. Tratamento BCG dia 21. Negativo para melanina e lipofuscina. (Schmorl's). Barra = 6  $\mu$ m.

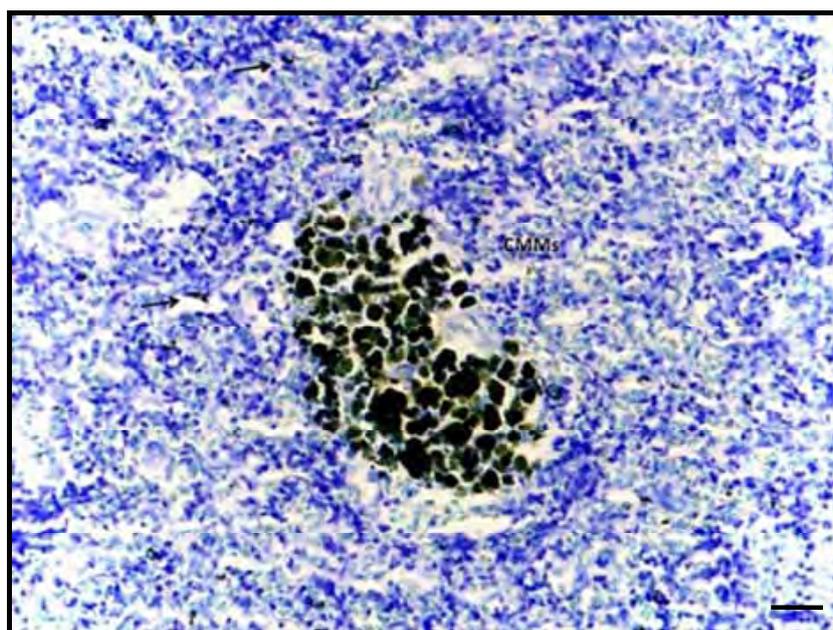


Figura 25. Fotomicrografia de baço. Centro de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos livres (seta) em *Oreochromis niloticus*. Grupo controle. (Azul de toluidina). Barra = 6  $\mu$ m.

Pela análise estatística (Tabela 6) pode-se observar que a média da área dos CMMs entre os tratamentos no 3<sup>o</sup> e 7<sup>o</sup> dia foram estatisticamente maiores quando comparados com o grupo controle. No 21<sup>o</sup> dia a área dos CMMs do tratamento IMP foi estatisticamente menor, quando comparado com os outros. No último dia os grupos não diferiram estatisticamente.

Pela análise das áreas dos CMMs ao longo do tempo, em cada tratamento, observou-se que os animais do grupo controle apresentaram áreas estatisticamente maiores nos dias 21 e 33 quando comparados com os outros dias. No tratamento IMP, nos dias 14, 21 e 33, as áreas foram estatisticamente maiores que nos dias 3 e 7. No tratamento IMP+BCG, os dias 21 e 33 as áreas foram estatisticamente maiores em relação aos outros grupos. Por sua vez as do dia 7 e 14 foram estatisticamente menores quando comparados com as do dia 21 e 33, mas não diferiu em relação ao observado no dia 3.

No tratamento BCG do dia 21 e 33 foi estatisticamente diferente quando comparados com os outros grupos e dos dias 3, 7 e 14 não apresentaram diferença entre eles.

Tabela 6. Valores médios e resultado da análise de variância (ANOVA)<sup>1</sup> das medidas das áreas dos CMMs<sup>2</sup> presentes no baço de *Oreochromis niloticus*.

Tratamento	Tempo (dias) <sup>3</sup>							Valor de F	Pr>F <sup>4</sup>
	3	7	14	21	33				
Controle	2391,45 <sup>Ab</sup>	2009,25 <sup>Bb</sup>	2275,86 <sup>Ab</sup>	3951,44 <sup>Aa</sup>	3711,61 <sup>Aa</sup>	0,74	0,5327		
IMP	3258,38 <sup>Ab</sup>	3338,69 <sup>Bb</sup>	3588,60 <sup>Aa</sup>	3611,71 <sup>Aa</sup>	3777,34 <sup>Aa</sup>	1,02	0,9528		
IMP + BCG	2752,88 <sup>Ac</sup>	2251,57 <sup>Bbc</sup>	2672,24 <sup>Ab</sup>	3731,23 <sup>Aa</sup>	4104,98 <sup>Aa</sup>	0,97	0,4237		
BCG	2814,17 <sup>Ab</sup>	2995,86 <sup>Ab</sup>	3048,33 <sup>Ab</sup>	3462,16 <sup>Aa</sup>	3698,84 <sup>Aa</sup>	0,95	0,3184		
Valor de F	0,95	2,89	2,35	3,98	0,27				
Pr>F <sup>4</sup>	0,4172	<0,0001	<0,0001	0,0093	0,8436				

IMP=implante; IMP +BCG= implante associado ao inóculo de BCG; BCG=inóculo de 20 µL de BCG (40 mg/mL).

<sup>(1)</sup> Média das 175 observações dos CMMs por tratamento (5 coletas x 7 lâminas x 5 campos), com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>(2)</sup> Área dos centros de melanomacrófagos (CMMs) em µm<sup>2</sup>.

<sup>(3)</sup> Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.

<sup>(4)</sup> Pr>F Probabilidade de significância de F.

A avaliação da quantidade de CMMs presentes no baço (Tabela 7) demonstrou que no tratamento controle, nos dias 14, 21 e 33, o número deles foi estatisticamente maior em relação aos outros tratamentos. Entre os dias 3 e 7 não houve diferença estatística quanto ao número de CMMs. No tratamento IMP também não houve diferença estatística do número de CMMs entre as duas quantificações. Para o tratamento IMP+BCG entre os dias 14, 21 e 33 não houve diferença estatística, mas quando comparados com os dias 3 e 7 foram estatisticamente maiores, com exceção do 33º dia, que foi igual aos dias 3 e 7. No tratamento BCG dos dias 21 e 33 o número de CMMs foi estatisticamente maior em relação aos outros dias. Os dias 7 e 14 foram diferentes se comparados com os do dia 3.

Tabela 7. Valores médios e resultado da análise de variância (ANOVA)<sup>1</sup> das contagens de CMMs2 presentes no baço de *Oreochromis niloticus*.

Tratamento	Tempo (dias) <sup>3</sup>					Valor de F	Pr>F <sup>4</sup>
	3	7	14	21	33		
Controle	4,2 <sup>Ab</sup>	3,8 <sup>Ab</sup>	6,1 <sup>Aa</sup>	5,4 <sup>Ba</sup>	5,7 <sup>Ba</sup>	0,57	0,6377
IMP	4,9 <sup>Ab</sup>	5,5 <sup>Ab</sup>	7,2 <sup>Aa</sup>	7,3 <sup>Aa</sup>	7,0 <sup>Ba</sup>	2,11	0,0095
IMP + BCG	5,0 <sup>Ab</sup>	6,2 <sup>Ab</sup>	7,2 <sup>Aa</sup>	7,1 <sup>Aba</sup>	6,6 <sup>Aab</sup>	3,79	0,0077
BCG	4,1 <sup>Ac</sup>	6,1 <sup>Ab</sup>	6,3 <sup>Ab</sup>	8,3 <sup>Aa</sup>	8,5 <sup>Aa</sup>	0,95	0,8834
Valor de F	3,97	4,59	1,84	8,90	9,27		
Pr>F <sup>3</sup>	0,0091	0,0040	0,1424	<0,0001	<0,0001		

IMP=implante; IMP+BCG= implante associado ao inóculo de BCG; BCG=inóculo de 20 µL de BCG (40 mg/mL).

<sup>(1)</sup> Média das 175 observações dos CMMs por tratamento (5 coletas x 7 lâminas x 5 campos), com pelo menos uma letra em comum não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

<sup>(2)</sup> Número de centros de melanomacrófagos (CMMs).

<sup>(3)</sup> Análise de variância esta representada por letras maiúsculas para comparação dos tratamentos dentro de cada dia estudado e letras minúsculas para comparação entre os diferentes dias estudados.

<sup>(4)</sup> Pr>F Probabilidade de significância de F.

O surgimento dos CMMs está relacionado a vários fatores e condições como órgão afetado (AGIUS, 1979b; KRANZ e PETERS, 1984) e diferentes condições fisiológicas dentro da mesma espécie, tais como a idade (AGIUS 1979a; AGIUS e ROBERTS, 1981; WOLKE et al., 1985; KRANZ e GERCKEN, 1987), condição nutricional (AGIUS, 1983; AGIUS e AGBEDE, 1984; MIZUNO et al., 2002), tipo de tecido (KRANZ, 1989) metabolismo de ferro e hemoglobina (FÜLÖP e McMILLAN, 1984), condições anatomopatológicas e inflamatórias (ELLIS, 1980; VOGELBEIN et al., 1987) e processos imunes (AGIUS 1981, 1985; FÜLÖP e McMILLAN, 1984) assim como em alterações ambientais (FOURNIE et al., 2001).

Embora no presente estudo as diferenças entre área e número de CMMs não tenham sido concluintes considerando o curto tempo de exposição aos estímulos, a tendência é o aumento como observado por De Vico et al. (2008), quando estudaram a infecção de *Sparicotyle chrisophrii* em *Sparus aurata* com a particularidade de encontrar altos níveis de lipofuscina no baço, contrario ao achado no presente estudo sendo principalmente hemossiderina.

Neste caso a hemossiderina é derivada da hemoglobina dos eritrócitos que, quando terminada sua vida média migram para o baço e são degradados. A lipofuscina corresponde a resíduos indigeríveis do metabolismo celular que gradualmente vão se polimerizando e formando complexos moleculares insolúveis. Então a diversidade entre as duas observações pode ser devida simplesmente à diferença na taxa de metabolização dos referidos pigmentos. Também é possível que a diferença seja atribuída ao tipo de agente patogênico empregado. Neste trabalho, o BCG foi aplicado na musculatura enquanto o estímulo estudado por De Vico et al. (2008) lesava diretamente a brânquia causando elevada hemorragia.

Os resultados do presente estudo corroboram os de Bucke et al. (1992) em relação ao achado de hemossiderina como principal pigmento dos CMMs em peixes submetidos a ambiente poluído. O achado de Herráez e Zapata (1986) em *Carassius auratus* de diferença entre número e tamanho de CMMs em curto período de estímulo (7 dias) pode ser atribuído à espécie utilizada e ao tipo de estímulo oferecido. Neste caso foram utilizadas células vermelhas do sangue de ovelha como estímulo, que causa uma reação aguda exudativa, ao contrário do BCG que induz inflamação crônica de caráter proliferativo.

Fournie et al. (2001) analisaram 983 baços de 9 espécies diferentes de peixes marinhos, coletados durante 3 anos e observaram que o número e área dos CMMs eram estatisticamente diferentes. Estes resultados são devidos ao longo período de exposição aos diferentes contaminantes, assim como às mudanças climáticas e ambientais. Geralmente, os CMMs são utilizados como bioindicador de poluição aquática (FOURNIE et al., 1996; SALIU, 1997; AYOADE e ICULALA, 2007; BALAMURUGAN et al., (*in press*)) assim como indicador de fatores estressantes (VIJAYAN, 1988; HUR et al., 2006; ALAGAPPAN et al. 2009). No presente trabalho esses achados não foram observados provavelmente devido ao curto tempo de observação e pelo fato do estímulo ser localizado, de tipo imune e não imune, enquanto os acima citados são de origem tóxica, sistêmica e períodos mais prolongados.

Outros autores descrevem estas alterações como resultados do tamanho, idade, gênero e espécie dos animais a serem avaliados (DABROWSKA et al. 2012) sem ser necessariamente consequência de poluição (FOURNIE et al., 2001; BALAMURUGAN et al. (*in press*)). Além disso há espécies que respondem de forma diferente quando expostos a fatores estressantes ou ambientais diferentes (HAAPARANTA et al., 1996).

A alta quantidade de hemossiderina encontrada nos CMMs deste trabalho discorda do observado por Biavati et al. (1996) no baço de *Sparus aurata* sadios que continha hemossiderina em baixas quantidades, apenas sendo detectável nos CMMs. De acordo com este autor a hemossiderose é semelhante à dos mamíferos.

Estas inferências não são compartilhadas com as do presente estudo, já que no grupo controle também foram achados altos níveis de hemossiderina e ausência de lipofuscina e melanina. Ribeiro et al. (2011) observaram que os CMMs do fígado e baço de *Prochilodus argenteus* possuem diferenças na composição elementar assim como nas características morfológicas, considerando o baço como órgão biomarcador de resposta imune e o fígado para avaliar o estado metabólico, especialmente na renovação celular e processos de armazenamento.

Este fato deve-se ao tempo de estímulo como também observado por Montero et al. (1999) e Agius e Roberts (2003) em peixes teleósteos. Outros estudos demonstram que peixes estimulados com bactérias não tiveram

diferenças estatística na formação destes centros, admitindo a hipótese do que o processo inflamatório por corpo estranho possa ter estimulado os mecanismos de formação destes centros.

Por outro lado, Abdel-Aziz et al. (2010) observaram que em *O. niloticus* os CMMs surgiam durante o desenvolvimento hematopoiético no rim, demonstrando que a formação destas estruturas ocorre em processos fisiológicos normais como em condições de intoxicação. Dias et al. (2007) que estudaram a formação de CMMs no baço de *O. niloticus* expostas durante 14 dias a diferentes concentrações de cloreto de mercúrio e observaram que a formação destes centros no baço estava relacionado à concentração e tempo de exposição.

Assim algumas espécies de peixes como *O. niloticus* expressam formação de CMMs em condições normais e o número e tamanho pode estar relacionado ao tipo e tempo de estimulação, gênero, espécie, idade entre outros (ABDEL-AZIZ et al., 2010; DIAS et al., 2007; AGIUS, 1985; BLAZER et al., 1987; WOLKE et al., 1985). Em outras espécies como *P. mesopotamicus* não se observou a presença de CMMs em condições normais ou após 33 dias da estimulação com o BCG, implante e sua associação.

Estudos com imunomarcção de CMMs realizados em teleósteos demonstraram que estes, junto com os melanomacrófagos são filogeneticamente precursores das células dendríticas foliculares dos centros germinativos, resposta antigênica semelhante às observadas em aves e mamíferos, característica associada a algum tipo de célula secretora de imunoglobulina (Ig) (Vigliano et al., 2006).

## **5.4. Imuno-histoquímica**

### **5.4.1 Anti-citoqueratina**

Para este anticorpo a positividade evidente começou a partir do 14<sup>o</sup> dia de inoculação; do terceiro ao sétimo dia houve presença de células imunomarcadas não compatíveis com células epitelióides, mas sim com endotélio indicando neovascularização. No 33<sup>o</sup> dia as células epitelióides foram imunomarcadas fortemente (Figura 26).

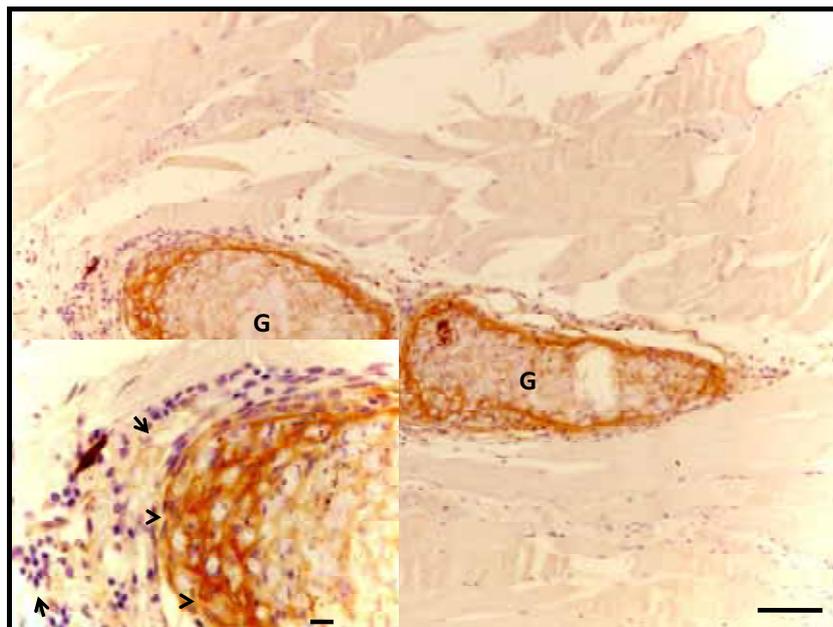


Figura 26. Fotomicrografia do músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50  $\mu$ m. Em detalhe, imunomarcaco para citoqueratina de células epitelióides (cabeça de seta) e infiltrado inflamatório (seta) (DAB). Barra = 10  $\mu$ m.

A evoluo do granuloma iniciou-se com a infiltrao de macrófagos que com o tempo foi se organizando para se dispor ao redor do inóculo, porém sem formao de centro caseoso ao contrário do observado por Romano et al. (2012), não entanto, neste caso, as espécies estudadas foram linguado (*Paralichthys orbignyanus*) e "barber goby" (*Elacatinus figaro*) nos quais foi diagnosticado *M. marinum*, diferente do empregado neste trabalho. As características de colorao celular desta observao evoluíram conforme o descrito por Gauthier et al. (2003), em que macrófagos com atividade fagocítica sofrem modificaes morfofisiológicas e se transformam em células epitelióides com atividade secretora. Este fato foi confirmado pela imunomarcaco para citoqueratina, resultados compatíveis com os obtidos por Noga et al. (1989) e Matushima (1994) em tilápias-do-nylo para caracterizar o mesmo evento.

#### 5.4.2 Anti- proteína S-100

A imunomarcaco foi positiva em todos os tempos, sendo que no terceiro dia após a inoculao do BCG, a marcao foi difusa e em menor intensidade, no sétimo dia a imunomarcaco se concentra ao redor do inóculo,

após o décimo quarto dia até o trigésimo terceiro dia é mais evidente a imunomarcação ao redor do inóculo (Figura 27).

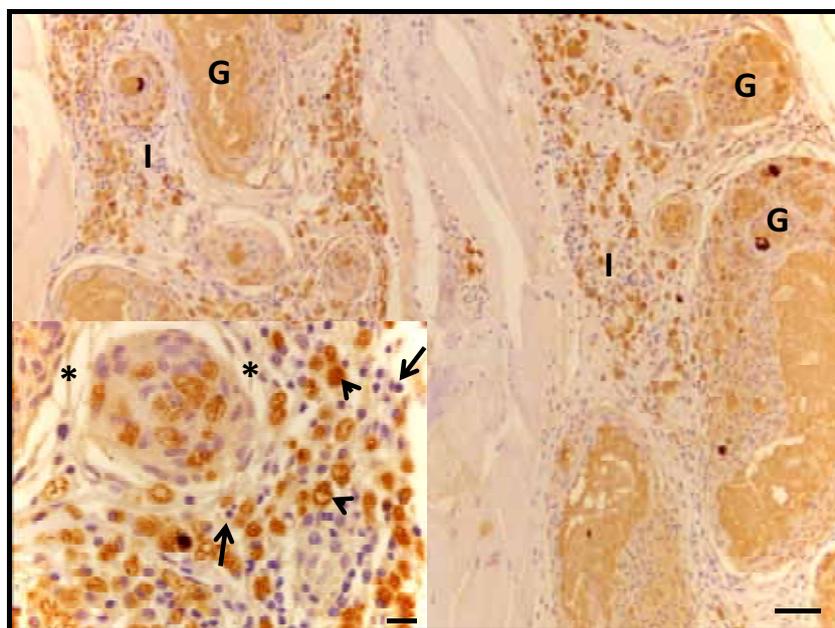


Figura 27. Fotomicrografia do músculo de *Piarractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50 µm. Em detalhe, macrófagos imunomarcados para proteína S-100 (cabeça de seta), fibroblastos (estrela) e linfócitos (seta) (DAB). Barra = 10 µm.

Durante o evento inflamatório observou-se inicialmente processo proliferativo, com início de atividade fagocítica pelos macrófagos identificados com a marcação pelo anticorpo S-100, como também observado em mamíferos (MOMOTANI et al., 1993). Esta marcação está relacionada principalmente à diferenciação (AGUIAR-PASSETI et al., 1997), transdução e transcrição celular (SCHÄFER e HEIZMANN, 1996) assim como às possíveis ações de algumas citocinas que têm atividade intra e extracelular semelhantes às da proteína S100 (HEIZMANN et al., 2002).

Mariano (1995) propôs a hipótese da persistência do granuloma imune atribuída à produção de antígenos específicos que vão estimular a produção de citocinas junto com ativadores não específicos, uma vez ativados os macrófagos as células epitelióides que produzirão outro sinal químico conhecido como fator desativador de macrófagos (MDF) que está associado à proteína ligante de cálcio - MRP-14, que vai desativar os macrófagos perdendo a capacidade fagocítica e se transformando em células epitelióides.

### 5.4.3 Anti-iNOS (Óxido nítrico induzível)

A imunomarcção do anti-iNOS foi positiva em todos os tempos, sendo que no terceiro dia após inoculação do BCG, a marcação foi difusa e em menor intensidade; no sétimo dia a imunomarcção se concentra na região do inóculo, em disposição circular; a partir do décimo quarto dia a formação do granuloma é mais organizada e até o trigésimo terceiro dia a marcação é mais evidente ao redor do inóculo (Figura 28).

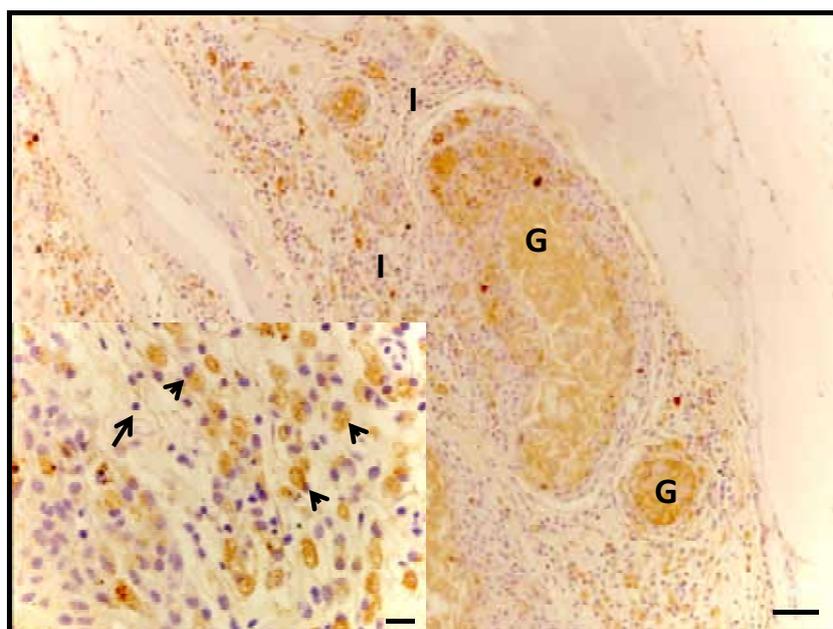


Figura 28. Fotomicrografia do músculo de *Piaractus mesopotamicus* 33 dias após a inoculação do BCG. Observam-se granulomas (G) e infiltrado inflamatório (I) (DAB). Barra = 50  $\mu$ m. Em detalhe, imunomarcção para iNOS em linfócitos (seta) e macrófagos (cabeça de seta). (DAB). Barra = 10  $\mu$ m.

A imunomarcção com o iNOS a partir do 3<sup>o</sup> após indução do processo inflamatório permite inferir que no pacu os macrófagos apresentem receptores mais precocemente em comparação com outras espécies, ou que os mediadores químicos como interleucina 1 (IL-1) sejam liberados mais cedo e então marcados (XU et al., 1999; PETRIVICH et al., 2000). O mesmo pode ser atribuído ao interferon-gama (IFN $\gamma$ ) (BARROS et al., 1998). Esta imunomarcção também pode estar relacionada com a resposta gerada pelos macrófagos com produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), como observado em mamíferos (SCHOOR e PLUMB, 1994; CAMPOS-PEREZ,

2000). Lozada et al. (2012) observaram que em *Psetta maxima* infectados com *Enteromyxum scophthalmi* teve aumento na expressão de iNOS no intestino e órgãos linfematopoiéticos como resposta imunológica, evento também observado no presente trabalho durante a formação do granuloma no músculo.

## 5.5 Lectino-histoquímica

### 5.5.1 WGA (Wheat Germ agglutinin)

Na análise com a lectina WGA observou-se que houve marcação uniforme dos bacilos que constituíam o inóculo e no citoplasma e membrana celular dos macrófagos. As células epitelióides não foram marcadas, mas foram diferenciadas pela contracoloração basófila na coloração com HE, pelo seu citoplasma abundante, núcleo arredondado e pálido e pela sua disposição ao redor do inóculo, constituindo as primeiras camadas de células inflamatórias do granuloma (Figura 29).

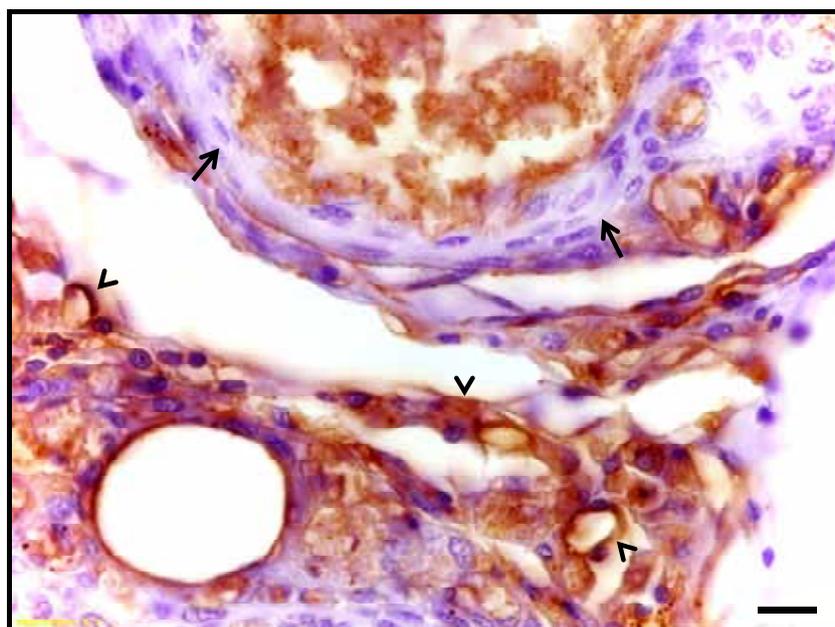


Figura 29. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observam-se macrófagos marcados no citoplasma (cabeça de seta) e células epitelióides que não foram marcadas (seta) com a lectina WGA). LHQ. Barra = 10  $\mu$ m.

O estabelecimento da micobactéria no hospedeiro é condicionado por ampla gama de adaptações. Esta relação patogênica envolve estruturas

glicosiladas, protéicas e lipídicas como o lipoarabinomanano (LAM) da parede bacteriana necessário para a ligação ao receptor de manose dos macrófagos (SCHLESINGER et al., 1996), e secreção de glicoproteínas, como a proteína Apa (Alanine proline antigen), que contribui para a adesão e invasão dos tecidos pela micobactéria (HORN et al., 1999). Esta expressão de glicoproteínas é a responsável pela marcação com a lecitina WGA.

A parede celular do bacilo e do macrófago é constituída por vários sacarídeos, entre estes N-acetil-glicosamina (KHASNOBIS et al., 2002) à qual se liga a WGA para marcar estas estruturas como demonstrado no presente trabalho. Em macrófagos ativados do peixe *Cynoscion guatucupa* (DÍAZ et al., 2005) e de fêmeas de ratos Wistar (SHEPHERD et al., 1981) o aumento e a diminuição da expressão de N-acetil-glicosamina são regulados por glicocorticóides e interferon gama, respectivamente (STAHL et al., 1984).

Os resultados deste trabalho demonstram que também no granuloma epitelióide induzido pelo BCG em *P. mesopotamicus* a expressão de N-acetil-glicosamina também ocorre e reage com a lecitina WGA.

### **5.5.2 DBA (*Dolichos biflorus* agglutin)**

Ao trigésimo terceiro dia de ter induzido a inflamação, a marcação da lectina DBA ocorreu principalmente nos fibroblastos e macrófagos. Não se observou algum tipo de marcação do inóculo nem células epitelióides (Figura 30).

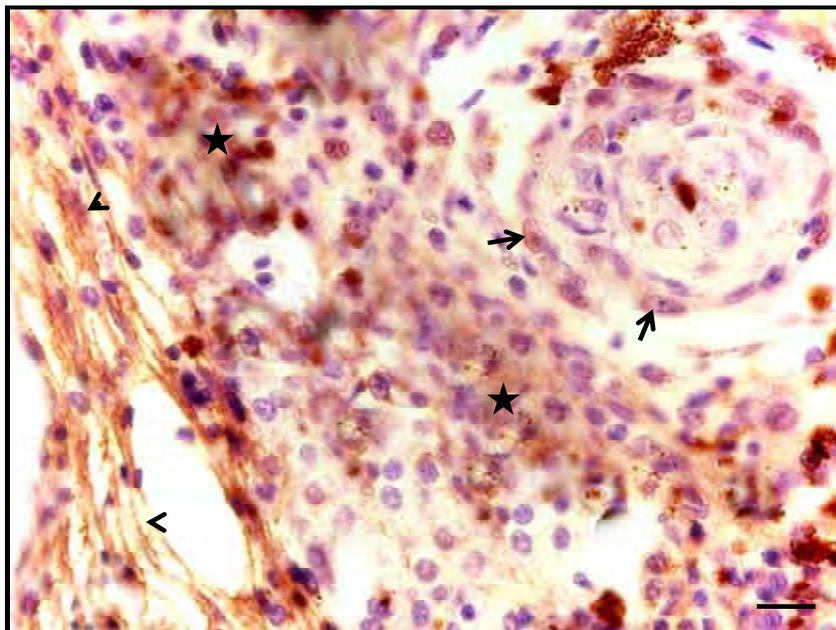


Figura 30. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observa-se leve marcação com DBA nos macrófagos (estrela) e forte marcação em fibroblastos (cabeça de seta), as células epitelióides não foram marcadas (seta). LHQ. Barra = 10  $\mu$ m.

A DBA é uma lecitina que se liga a receptores N-acetil-galactosamina, mas na literatura consultada não se encontrou evidências da marcação de macrófagos e fibroblastos, como observado no presente ensaio. Há evidências do uso desta lecitina na marcação de alguns tipos de células em diferenciação como as do túbulo coletor dos metanefros renais (MICHAEL et al., 2007) e de linfócitos natural killer uterinos de ratos (uNK) (CHEN et al., 2012). Esta marcação deve-se à presença de grânulos de perforina, granzimas e uma gama de enzimas hidrolíticas lisossomais (PATAFFARO et al., 2003). No último caso elas podem estar relacionadas à marcação dos macrófagos, já que a expressão e secreção destas está presente na sua atividade fagocítica (KAMINSKI et al., 1985). A marcação de fibroblastos pode estar relacionada ao glicosaminoglicano, localizado na superfície celular, que seja reconhecido por esta lecitina. Então os resultados deste ensaio sugerem que os macrófagos sejam marcados em função de suas enzimas lisossomais e os fibroblastos graças à presença glicosaminoglicanos de superfície.

### 5.5.3 HPA (*Helix pomatia* agglutinin)

A marcação com a lectina HPA no trigésimo terceiro dia de ter induzido a inflamação, apresentou marcação nos macrófagos e fibroblastos. Células epitelióides e linfócitos não foram marcados (Figura 31).

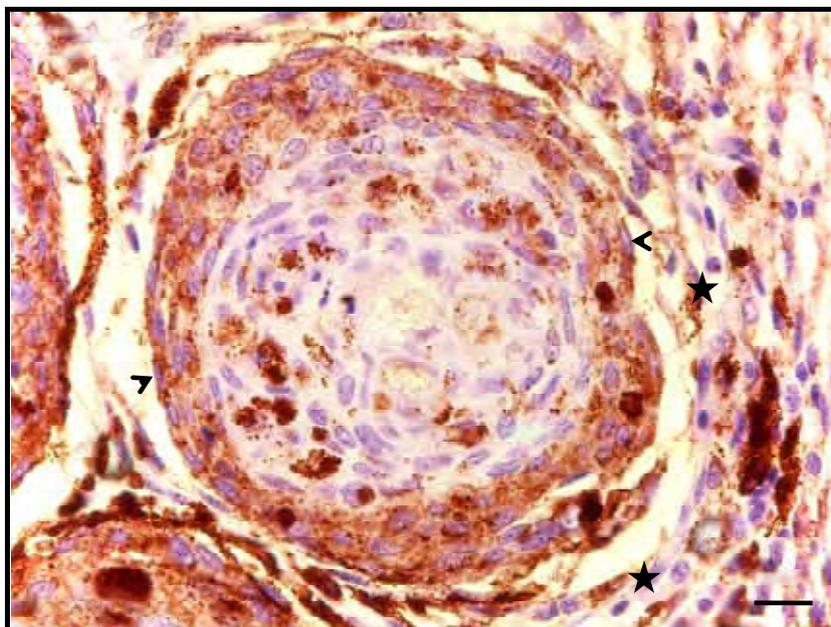


Figura 31. Fotomicrografia do granuloma induzido com BCG no músculo de *Piaractus mesopotamicus*, após 33 dias do inóculo. Observou-se marcação da HPA em macrófagos (cabeça de seta) e marcação leve nos fibroblastos (estrela). LHQ. Barra = 10  $\mu$ m.

Neste trabalho a HPA marcou os macrófagos, mas não outros componentes do granuloma epitelióide. Esta marcação provavelmente é devida à presença do receptor para N-acetil-galactosamina, como identificado em macrófagos residentes da placenta humana (MITCHELL e SCHUMACHER, 1999) e na derme de camundongos (DUPASQUIER et al., 2006). Então, de acordo com os resultados aqui observados, fenômeno semelhante ocorre com macrófagos presentes no granuloma epitelióide induzido pelo BCG.

Os macrófagos têm elevada capacidade fagocitária e ao se transformarem em células epitelióides cuja atividade é predominantemente secretora, perdem parte de seus receptores de superfície (MARIANO, 1995). Neste ensaio as células epitelióides não apresentaram marcação pelas lectinas dependentes de receptores para N-acetil-glicosamina e N-acetil-

galactosamina, provavelmente perdidos quando as células eminentemente fagocíticas se transformaram em secretoras no granuloma epitelióide.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados nas condições deste ensaio permitem concluir que:

O processo inflamatório crônico granulomatoso induzido pelo inóculo de BCG em *P. mesopotamicus* e *O. niloticus* foi caracterizado como tipo epitelióide.

A cinética do acúmulo de macrófagos ao longo do tempo foi igual em ambas as espécies estudadas, mas diferente na formação de células epitelióides sugerindo resposta inespecífica mais rápida em *O. niloticus* do que em *P. mesopotamicus* e que o estímulo imune não interferiu na cinética do acúmulo de macrófagos nas lamínulas em ambas as espécies.

A formação de centros de melanomacrófagos no baço de *O. niloticus* aumentaram em número e área conforme o tempo e tipo de estímulo. No *P. mesopotamicus* não se formaram estes centros.

Ficou demonstrado que as lectinas WGA, DBA e HPA permitiram identificar seus receptores em macrófagos com atividade fagocítica, fibroblastos e bacilos no granuloma epitelióide induzido pelo BCG.

Os anticorpos testados, inespecíficos para a espécie estudada, demonstraram clara positividade nas células alvo e permitiram a classificação do granuloma como do tipo epitelióide.

## 7. REFERÊNCIAS

ABDEL-AZIZ, EL-SH.; ABDU, S. B.; ALI, TEL-S.; FOUAD, H. F. Haemopoiesis in the head kidney of tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae): a morphological (optical and ultrastructural) study. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht, v. 36, n. 3, p. 323-336, 2010.

ADAMS, A.; THOMPSON, K. D.; MCEWAN, H.; CHEN, S. C.; RICHARDS, R. H. Development of monoclonal antibodies to *Mycobacterium* spp. isolated from chevron snakeheads and siamese fightingfish. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 8, n. 3, p. 208-215, 1996.

AGIUS, C.; AGBEDE, S. A. An electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 24, p. 471-488, 1984.

AGIUS, C. **Aspects of the melano-macrophage centres in fish.**1979a. PhD (Thesis) - University of Stirling, Scotland, 1979a.

AGIUS, C. On the failure to detect haemosiderin in the melano-macrophages of the dogfish *Scylorhinus canicula* (Linnaeus) after prolonged starvation. **Experientia**, Basel, v. 39, p. 64-67, 1983.

AGIUS, C. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**, West Sussex, v. 191, n. 1, p. 11-31, 1980.

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 19, p. 161-169, 1981.

AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 499-509, 2003.

AGIUS, C. The effects of splenectomy and subsequent starvation on the storage of haemosiderin by the melano-macrophages of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 18, p. 41-44, 1981.

AGIUS, C. The melano-macrophage centres in fish: a review. In: Manning, M. J.; Tatner, M. F. (Ed.). **Fish Immunology**. London: Academic Press, 1985. p. 85-105.

AGIUS, C. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 2, n. 4, p. 337-343, 1979b.

ALAGAPPAN, K. M.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M. Histopathological alterations in estuarine catfish (*Arius maculatus*; Thunberg, 1792) due to *Aeromonas hydrophila* infection. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, Dubai, v. 1, n. 3, p. 185-189, 2009.

ALI, S. M.; WAFI, M. I. A.; ABBAS, W. T. Evaluation of Azotobacter and Azospirillum biofertilizers as a probiotics in *Oreochromis niloticus* aquaculture. **Journal Fisheries and Aquatic Science**, New York, v. 6, p. 535-544, 2011.

ANDERSON, J. M.; DEFIFE, K.; MCNALLY, A.; COLLIER, T.; JENNEY, C. Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Secaucus, v. 10, n. 10-11, p. 579-588, 1999.

ANDERSON, J. M.; RODRIGUEZ, A.; CHANG, D. T. Foreign body reaction to biomaterials. **Seminars in Immunology**, London, v. 20, n. 2, p. 86-100, 2008.

AYOADE, A. A.; IKULALA A. O. O. Length weight relationship, condition factor and stomach contents of *Hemichromis bimaculatus*, *Sarotherodon melanotheron* and *Chromidotilapia guentheri* (Perciformes: Cichlidae) in Eleiyele Lake, Southwestern Nigeria. **Journal of Tropical Biology**, San Jose, v. 55, n. 3-4, p. 969-977, 2007.

AYROZA, D. M. M. R.; SCORVO, C. M. D. F. A qualidade da água para fins de piscicultura. In: AYROZA, L. M. da S. (Coord.). **Piscicultura**. Campinas: CATI, 2011. p. 246. Manual técnico, n. 79.

BALAMURUGAN, S. A.; DEIVASIGAMANI, B.; KUMARAN, S.; SAKTHIVEL, M.; RAJSEKAR, T.; PRIYADHARSINI, P. Melanomacrophage centers aggregation in *P. lineatus* spleen as bio-indicator of environmental change. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, Beijing, v. 2, p. S635-S638, 2012. Supplement 2.

BELO, M. A. A.; MORAES, J. E. R.; SOARES, V. E.; MARTINS, M. L.; BRUM, C. M.; MORAES, F. R. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 7, p. 1015-1021, 2012.

BELO, M. A. A.; SCHALCH, S. H. C.; MORAES, F. R.; SOARES, V. E.; OTOBONI, A. M. M. B.; MORAES, J. E. R. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 133, n. 2-3, p. 146-54, 2005.

BIAVATI, S.; DELLA SALDA, L.; MANERA, M. Histochemistry and ultrastructure of the macrophage aggregate (MAs) of *Sparus aurata* L.: preliminary results. **European Journal of Veterinary Pathology**, Cremona, v. 2, p. 51-52, 1996. Supplement.

BIRMAN, E. G.; MARIANO, M. The influence of inflammatory agents of giant cell formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 18, n. 4, p. 507-512, 1985.

BLAZER, V. S.; WOLKE, R. E.; BROWN, J.; POWEL, C. A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effect of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 10, n. 4, p. 99-215, 1987.

BLUMENTHAL, R. Sur le role erythrolytique de la rate chez les poissons. **Comptes Rendus de l'Academie des Sciences**, Amsterdam, v. 146, p. 190-191, 1908.

BONDAD-REANTASO, M. G.; SUBASINGHE, R. P.; ARTHUR, J. R.; OGAWA, K.; CHINABUT, S.; ADLARD, R.; TAN, Z.; SHARIFF, M. Disease and health management in Asian aquaculture. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 132, n. 3-4, p. 249-272, 2005.

BRITO, T.; FRANCO, M. F. Viewpoint granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina tropical**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 185-192, 1994.

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. **Peixes do Pantanal**: manual de Identificação. Brasília, DF: Embrapa, Serviço de Produção de Informação, 2007. p. 227.

BUCKE, D.; VETHAAK, A. D.; LANG, A. T. Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. **Marine Ecology Progress Series**, Oldendorf, v. 91, n. 1-3, p. 193-196, 1992.

CALCAGNOTTO, D. **Caracterização de bancos genéticos selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através da análise do DNA mitocondrial**. 1998. 131 f. Tese (Doutorado em [Agronomia]) - Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

CAMPOS, C. M.; MOARES, J. R. E.; MOARES, F. R. Histopatologia de fígado, rim e baço de *Piaractus mesopotamicus*, *Prochilodus lineatus* e *Pseudoplatystoma fasciatum* parasitados por myxosporídeos, capturados no rio Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 200-205, 2008.

CAMPOS-HERRERO, M. I.; BORGHETTI, N. R. B.; OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; NOGUERA, F. J.; ACOSTA, A.; LAFARGA, B. *M. marinum* skin infection. **Antimicrobics and Infectious Diseases Newsletter**, New York, v. 14, p. 75-76, 1995.

CARNEIRO, D. J.; WAGNER, P. M.; DIAS, T. C. R. Efeito da densidade de estocagem e do nível de proteína bruta na dieta, no desempenho de produção de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: ENCONTRO NACIONAL DE AQUICULTURA, 1995, Local. **Anais...** Local: Editora, 1995. p. 52-61.

CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as stress response mitigator of matrinxã *Brycon cephalus* during transport. **Aquaculture Research**, West Sussex, v. 32, n. 4, p. 297-304, 2001.

CASTAGNOLLI, N. Situação atual e perspectivas da aqüicultura no Brasil. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXES E CRUSTÁCEOS, 1., 1995, Campos do Jordão. **Anais...** Campinas: CBNA, 1995. p. 154.

CASTAGNOLLI, N.; ZUIM, S. M. F. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu (*Colossoma mitrei* Berg 1895)**. Jaboticabal: FCAV/UNESP, 1985. 26p.

CATELLA, A. C.; PEIXER, J.; PALMEIRA, S. S. **Sistema de controle de pesca de Mato Grosso do Sul, SCPESCA/MS-1 maio/1994 à abril/1995**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP/SEMADES-MS, 1996. 49 p. (Documentos, 16).

CHINABUT, S.; LIMSUWAN, C.; CHANRATCHAKOOL, P. Mycobacteriosis in the snakehead, *Channa striatus* (Fowler). **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 13, n. 6, p. 531-535, 1990.

COLLIER, T. O.; ANDERSON, J. M.; KIKUCHI, A.; OKANO, T. Adhesion behavior of monocytes, macrophages, and foreign body giant cells on poly (N-isopropylacrylamide) temperature-responsive surfaces. **Journal of Biomedical Material Research**, Hoboken, v. 59, n. 1, p. 136-43, 2002.

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

CUENOT, L. Nephrophagocytes dans le couer at le rein de poissons osseux. **C. r. Séance Société de Biologie**, v. 62, p. 750-752, 1907.

DABROWSKA, H.; OSTASZEWSKA, T.; KAMASZEWSKI, M.; ANTONIAK, A.; NAPORA-RUTKOWSKI, L.; KOPKO, O.; LANG, T.; FRICKE, N. F.; LEHTONEN, K. K. Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 78, p. 14-21, 2012.

DEFIFE, K. M.; JENNEY, C. R.; MCNALLY, A. K.; COLTON, E.; ANDERSON, J. M. Interleukin-1 3 Induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. **Journal of Immunology**, Bethesda, v. 158, n. 7, p. 3385-3390, 1997.

DIAS, D. C.; MAIORINO, F. C.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; ISHIKAWA, N. M.; LOMBARDI, J. V.; FERREIRA, J. R.; FRANÇA, F. M.; FERREIRA, C. M. Avaliação histopatológica do baço, coração e encéfalo de tilápia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) exposta ao cloreto de mercúrio. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 213-220, 2007.

EDELSTEIN, L. M. Melanin: a unique biopolymer. In: IOACHIM, H. L. (Ed). **Pathobiology annual**. New York: Appleton-Century-Crofts, 1971. p. 309-324.

ELLIS, A. E.; DE SOUSA, M. A. B. Phylogeny of the lymphoid system. 1. A study of the fate of circulating lymphocytes in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 4, p. 338-343, 1974.

ESPECTOR, W. G.; RYAN, G. B. New evidence for the existence of long lived macrophages. **Nature**, London, v. 221, p. 869, 1969.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008**. Roma: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, 2009.

FERGUSON, H. W. **The reticulo-endothelial system of teleost fish with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.)**. 1976a. Thesis (PhD) - University of Stirling, Scotland, 1976.

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

FISHELSON, L. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 267, n. 1, p. 57-69, 2006.

FLORES, C. Q. **Respostas locais e sistêmicas induzidas por endotoxina em *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) tratados com cromo**. 2002. 67 f. Dissertação (Mestrado em aquicultura) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2002.

FOURNIE, J. W.; SUMMERS, J. K.; COURTNEY, L. A.; ENGLE, V. D. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. **Journal of Aquatic Animal Health**, Bethesda, v. 13, n. 2, p. 105-116, 2001.

FOURNIE, J. W.; SUMMERS, J. K.; WEISBERG, S. B. Prevalence of gross pathological abnormalities in estuarine fishes. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, v. 125, n. 4, p. 581-590, 1996.

FÜLÖP, G. M. I.; McMILLAN, D. Phagocytosis in the spleen of the sunfish *Lepomis* spp. **Journal of Morphology**, Hoboken, v. 179, n. 2, p. 175-195, 1984.

GAUTHIER, D. T.; RHODES M. W.; VOGELBEIN, W. K.; KATOR, H.; OTTINGER, C. A. Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. **Disease of Aquatic Organisms**, Oldenford, v. 54, n. 2, p. 105-117, 2003.

GAUTHIER, D. T.; VOGELBEIN, W. K.; OTTINGER, C. A. Ultrastructure of *Mycobacterium marinum* granuloma in striped bass *Morone saxatilis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldenford, v. 62, n. 1-2, p. 121-132, 2004.

GILMAN, T.; WRIGHT, L. J. Probable in vivo origin of multinucleate giant cells from circulating mononuclears. **Nature**, London, v. 209, n. 5020, p. 263-265, 1996.

GLUCKMAN, S. *Mycobacterium marinum*. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 13, p. 273-276, 1995.

GOMÉZ, S. Short communication unusual morphopathological features in case of fish tuberculosis. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 21, n. 3, p. 137-141, 1998.

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

GRIMSTONE, A. V.; SKAER, R. J. **A guidebook to microscopical methods**. London: Cambridge University Press, 1972.

GU, L.; TSENG, S. C.; ROLLINS, B. J. Monocyte chemoattractant protein-1. **Chemical Immunology**, Basel, v. 72, p. 7-29, 1999.

HAAPARANTA, A.; VALTONEN, E. T.; HOFFMANN, R.; HOLMES, J. Do macrophage centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality? **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 253-272, 1996.

HEDRICK, R. P.; MCDOWELL, T.; GROFF, J. Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. **Journal of Wildlife Disease**, Lawrence, v. 23, n. 3, p. 391-95, 1987.

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

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

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

HUR, J. W.; WOO, S. R.; JO, J. H.; PARK, I. S. Effects of starvation on kidney melano-macrophage centre in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). **Aquaculture Resesearch**, West Sussex, v. 37, n. 8, p. 821-825, 2006.

ISHIKAWA, C. M. **Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) inoculados experimentalmente com *Mycobacterium marinum* ATCC 927**. 1998. 59 f. Dissertação (Mestrado em [Zootecnia]) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

JAKOWSKA, S.; NIGRELLI, R. F. Localized response to experimental inflammation caused by pathogenic bacteria. **Anatomical Record**, Hoboken, v. 117, p. 526, 1953.

JOMORI, R. K.; CARNEIRO, D. J.; MALHEIROS, E. B.; PORTELLA, M. C. Growth and survival of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles reared in ponds with different initial larvicultura periods indoors. **Aquaculture Nutrition**, Malden, v. 8, n. 1, p. 169-174, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. V.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. **Histochemical Journal**, Dordrecht, v. 11, n. 4, p. 447-455, 1979.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In: GRASSHOF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976. p. 117-118.

KRANZ, H. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab, *Limanda limanda* during and after infection with ulcer disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, Oldendorf, v. 6, n. 3, p. 167-173, 1989.

KRANZ, H.; GERCKEN, J. Effects of sublethal concentration of potassium dichromate on the occurrence of splenic melanomacrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Biology**, West Sussex, v. 31, p. 75-80, 1987. Supplement A.

KRANZ, H.; PETERS, N. Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernuus*) from the Elbe Estuary. **Helgolander Meeresuntersuchungen**, Heidelberg, v. 37, p. 415-424, 1984.

KULLAVANIJAYA, P. Atypical mycobacterial cutaneous infection. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 17, p. 153-58, 1999.

KYRIAKIDES T. R.; FOSTER, M. J.; KEENEY, G. E.; TSAI, A.; GIACHELLI, C. M.; CLARK-LEWIS, I.; ROLLINS, B. J.; BORNSTEIN, P. The CC Chemokine Ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation: growth factors, cytokines, cell cycle molecules. **American Journal of Pathology**, New York, v. 165, n. 6, p. 2157-2166, 2004.

LAMERS, C. H. J.; DE HAAS, M. J. H. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 242, n. 3, p. 491-498, 1985.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). **Acta Histochemica**, Munich, v. 109, n. 2, p. 164-168, 2007.

LEKNES, I. L. Melano-macrophage centres in the liver of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, Poeciliidae: Teleostei. **Zoology**, Jena, v. 107, n. 3, p. 201-204, 2004.

LEKNES, I. L. Ultrastructure of atrial endocardium and myocardium in three species of Gadidae (Teleostei). **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 210, n. 1, p. 1-10, 1980.

LILLIE, R. D. A Nile blue staining technic for the differentiation of melanin and lipofuscins. **Stain Technology**, London, v. 31, n. 4, p. 151-153, 1956.

LOSADA, A. P.; BERMÚDEZ, R.; FAÍLDE, L. D.; QUIROGA, M. I. Quantitative and qualitative evaluation of iNOS expression in turbot (*Psetta maxima*) infected with *Enteromyxum scophthalmi*. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 32, n. 2, p. 243-248, 2012.

LOVISHIN, L. L.; CYRINO, J. E. P. Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 1998, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: CBNA, 1998. p. 1-20.

MACCHI, G. J.; ROMANOL, A.; CHRISTIANSEN, H. E. Melanomacrophage centres in white mouth croaker *Micropogonias furneyi*, as biological indicators of environmental changes. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 40, p. 971-973, 1992.

MARIANO, M.; SPECTOR, M. G. The formation and properties of macrophage polycarions (inflammatory giant cells). **Journal of Pathology**, New York, v. 113, p. 1-19, 1974.

MARIANO, M. The experimental granuloma: a hypothesis to explain the persistence of lesion. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 161-176, 1995.

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

MATUSHIMA, E. R. **Cinética da reação inflamatória induzida pela carragenina na bexiga natatória de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo)**. 1998. 53 f. Dissertação (Mestrado em [Zootecnia]) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 1998.

MATUSHIMA, E. R.; LONGATO FILHO, A.; KANAMURA, C. T.; SINHORINI, I. L. Experimental chronic granulomatous inflammatory process in fish: a morphological, ultrastructural and immunocytochemical study. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 152-158, 2006.

MCNALLY, A. K.; ANDERSON, J. M. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages: differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. **American Journal of Pathology**, New York, v. 147, n. 5, p. 1487-1499, 1995.

MESEGUER, J.; LOPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M. A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 277, p. 1-10, 1994.

METCHNIKOFF, E. **Lectures on the comparative pathology of inflammation**. New York: Dover, 1968. Monograph.

MIYAZAKI, T.; KAIGE, N. Comparative histopathology of edwardsiellosis in fishes. **Fish Pathology**, [S.l.], v. 20, p. 219-227, 1985.

MIZUNO, S.; MISAKA, N.; MIYAKOSHI, Y.; TAKEUCHI, K.; KASAHARA, N. Effects of starvation on melano-macrophages in the kidney of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 209, p. 247-255, 2002.

MONTERO, D.; BLAZER, V. S.; SOCORRO, J.; IZQUIERDO, M. S.; TORT, L. Dietary and culture influences on macrophage aggregate parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 179, p. 523-534, 1999.

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

PASNIK, D. J.; SMITH, S. A. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium Marinum* in fish. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 103, p. 195-206, 2005.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry**: theoretical and applied. 4th ed. London: Longman Press, 1980. v. 2.

PEINGNOUX-DEVILLE, J.; BOART, C.; VIDAL, B. Demonstration of bone resorbing cells in elasmobranchs: comparison with osteoclasts. **Tissue and Cell**, Heidelberg, v. 21, n. 6, p. 925-933, 1989.

PEIXER, J.; PETRERE, J. M. Hook selectivity of the Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 67, n. 2, p. 339-345, 2007.

PETRIC, M. C.; MARTINS, M. L.; ONAKA, E. M.; MORAES, J. R. E.; MORAES, F. R.; MALHEIROS, E. B. Suplementação alimentar com vitamina C potencializa a formação de macrófagos policariontes em *Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 (osteichthyes: characidae). **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 69-76, 2003.

PICKFORD, G. W. Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus heteroclitus* (L). **Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection**, New Haven, v. 14, p. 5-41, 1953.

PRESS, C.; EVENSEN, O.; REITAN, L. J.; LANDSVERK, T. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of administration. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 19, p. 215-224, 1996.

PULLELA, S. V. S. **Aquaculture of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a comparison of its quality: microbiological, sensory and proximate composition**. 1997. 191 f. Dissertação (Master of Science) – Department of Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 1997.

PULSFORD, A.; MATHEUS, R. A. Macrophages and giant cells associated with a microsporidian parasite causing liquefaction of the skeletal muscle of the Norway pout, *Trisopterus esmarkii*. **Journal of Fish Disease**, Oxford, v. 14, p. 67-78, 1991.

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

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

RESENDE, E. K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin excluding the Upper Paraná River. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states**. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAERS, A. (Ed). Victoria: World Bank, 2003. p. 99-155.

RIBEIRO, H. J.; PROCÓPIO, M. S.; GOMES, J. M. M.; VIEIRA, F. O.; RUSSO R. C.; BALZUWEIT, K.; CHIARINI-GARCIA, H.; CASTRO, A. C. S.; RIZZO, E.; CORRÊA, J. D. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 346, p. 417-425, 2011.

ROBERTS R. J. **Fish Pathology**. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

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

ROMANO, L. A.; SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B. Micobacteriose por *Mycobacterium marinum* em "linguado" *Paralichthys orbignyanus* e em "barber goby" *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Seropedica, v. 32, n. 3, p. 254-258, 2012.

ROSS, L. G.; ROSS, B. The stages of anaesthesia. In: BLACKWELL PUBLISHING (Ed.). **Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals**. Oxford, UK: Garsington Road, 2008. p. 45-47.

RYAN, G. B.; SPECTOR, W. G. Macrophage Turnover in Inflamed Connective Tissue. **Proceedings of the Royal Society of London (B)**, London, v. 175, p. 269-292, 1970.

SADO, R. Y.; MATUSHIMA, E. R. Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus spp.*) ao BCG. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, p. 58-64, 2007.

SADO, R. Y.; MATUSHIMA, E. R. Histopathological, immunohistochemical and ultrastructural evaluation of inflammatory response in *Arius genus* fish under experimental inoculation of BCG. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, p. 929-935, 2008.

SAINT-PAUL, U. The neotropical serrasalmid *Colossoma macropomum* a promising species for fish cultures in Amazonia. **Animal Research**, Cambridge, v. 22, p. 7-35, 1985.

SAS (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM). User's guide: statistics. Version 8. Cary: [s.n.], 842 p.

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

TIMUR, G.; TIMUR, M. Giant cell reaction associated with *Ichthyophonus hoferi* in wild plaice, *Pleuronectes platessa*. **Journal of Fishes Diseases**, Oxford, v. 7, p. 513-14, 1984.

UGADDAN, G. R.; OCAMPO, P. P. Brain acetylcholinesterase (AChE) activity and liver melano macrophage centers (MMCs) formation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) following exposure to glyphosate herbicide. **Asia Life Sciences**, Laguna, v. 18, n. 1, p. 73-85, 2009.

VAZZOLER, A. E. A. M.; SUZUKI, H. I.; MARQUES, E. E.; LIZAMA, M. A. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: VAZZOLER, A. E. A. M.; AGOSTINHO, A. A.; HAHN, N. S. (Ed.). **A planície de inundação do alto rio Paraná**: aspectos físicos, biológicos e socio econômicos. Maringá: EDUEM, 1997. p. 249-265.

VIGLIANO, F. A.; BERMUDEZ, R.; QUIROGA, M. I.; NIETO, J. M. Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. **Fish and Shellfish Immunology**, London, v. 21, p. 467-471, 2006.

VIJAYAN, M. M.; LEATHERLAND, J. F. Effects of stocking density on the growth and stress response in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 75, p. 159-170, 1988.

VOGELBEIN, W. K.; FOURNIE, J. W.; OVERSTREET, R. M. Sequential development and morphology of experimentally induced hepatic melano-macrophage centres in *Rivulus marmoratus*. **Journal of Fish Biology**, Malden, v. 31, p. 145-153, 1987.

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

WOLKE, R. E.; MURCHELANO, R. A.; DICKSTEIN, C.; GEORGE, C. J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 35, p. 222–227, 1985.

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

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCIA-BORON, J. C.; FERRER, C. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, v. 61, n. 4, p. 305-316, 1998.