

Avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e ultra-estrutural da resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus spp.*) ao BCG

Ricardo Yuji SADO¹
Eliana Reiko MATUSHIMA²

1 - Setor de Piscicultura da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP

2 - Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP

Correspondência para:

Ricardo Yuji Sado
Setor de Piscicultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo, Av. Pádua Dias 11, Cx.P.09, CEP 13418-900, Piracicaba, Brasil. email: rysado@esalq.usp.br/ricardo_sado@yahoo.com

Recebido para publicação: 15/05/2006
Aprovado para publicação: 23/08/2007

Resumo

Objetivo do estudo foi avaliar a cinética da resposta inflamatória induzida experimentalmente com BCG em peixes modernos pertencentes ao gênero *Centropomus* sp. Os animais foram experimentalmente inoculados com BCG por via intramuscular na região do pedúnculo caudal sendo realizada a coleta do material nos tempos experimentais de 1, 3, 7, 14, 21 e 33 dias pós-inoculação. A fase aguda da resposta inflamatória se mostrou na forma de infiltrado composto predominantemente por células mononucleares, edema intersticial e necrose de tecido muscular. À medida que o processo se desenvolve, observa-se a organização do foco lesional na forma de um granuloma formado por células epitelióides. Essas células, ao exame imunohistoquímico apresentaram positividade a proteína S100 e citoqueratina, indicando características macrofágicas e secretória, além de apresentarem ao exame ultra-estrutural a presença de desmosomos entre as células adjacentes. Não houve participação efetiva de células gigantes e pigmentares, sugerindo ser uma característica relacionada à espécie.

Palavras-chave:

Peixe.
Histopatologia.
Inflamação.
Célula epitelióide.
Granuloma.

Introdução

A resposta inflamatória pode ser definida sob duas formas, aguda e crônica. A inflamação crônica caracterizada pela formação de granulomas pode ser composta de várias de células, como macrófagos, linfócitos, fibroblastos e granulócitos.¹ Os granulomas podem ser denominados em "granulomas por corpo estranho" e "granulomas imunes". O primeiro é formado em resposta a partículas inertes, como talco e fio de sutura cirúrgico, caracterizado pela presença de camadas de células epitelióides e células gigantes, com o inóculo no centro da lesão. Os granulomas imunes são formados em resposta às partículas insolúveis com capacidade de estimular a resposta imune celular, como nas mycobacterioses ou com a utilização do BCG - cepas atenuadas de *Mycobacterium bovis*.

Esses são compostos por células epitelióides com conteúdo necrótico na região central do granuloma.¹

Baseando-se na teoria evolutiva de Darwin, Metchnikoff² desenvolveu estudos sobre a resposta inflamatória com espécimes de diferentes filos, classes e ordem de metazoários propondo que a complexidade do processo inflamatório acompanha a complexidade da evolução natural das espécies animais. Em peixes, tal complexidade está presente na resposta inflamatória crônica de diversas espécies, e pertencentes filogeneticamente a grupos distintos. Segundo Gosline³ os peixes teleósteos podem ser divididos em três grupos distintos: primitivos, intermediários e modernos.

Em peixes modernos da espécie *Channa striatus*, "snakehead"⁴, *Odonthestes bonariensis*, peixe rei⁵, *Oreochromis niloticus*, tilápia

do Nilo⁶, *Dicentrarchus labrax*, “seabass” europeu⁷ e *Sparus aurata*, “gilthead seabream”⁸ a resposta inflamatória crônica granulomatosa é composta por células epitelióides circunscrevendo o inóculo, os quais possuem amplo citoplasma vacuolizado e núcleo contendo cromatina frouxa podendo apresentar células pigmentares ao redor do granuloma^{4, 6, 7, 8}. Em contrapartida, na maioria dos peixes teleosteos primitivos, *Prosopium williamsoni*⁹, *Ictalurus punctatus*, bagre do canal¹⁰, *Corydora nattereri*, corydora,¹¹ há formação de células gigantes circunscrevendo o patógeno no decorrer do processo inflamatório sem a formação de um granuloma e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides^{12, 13, 14}.

Dentre os vertebrados ectotérmicos, o estudo do processo inflamatório já é conhecido; mas há extensas lacunas no conhecimento deste fenômeno que devem ser preenchidas, principalmente dos pontos de vista filogenético e patológico, já que o fenômeno em peixes ainda não está claro devido à falta de estudos morfológicos em condições controladas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar a resposta inflamatória crônica do robalo (*Centropomus spp.*) dos pontos de vista histopatológico, imuno-histoquímico, ultraestrutural e filogenético.

Material e Método

Animais

Foram utilizados 52 robalos (média de 26,83 cm), peixe pertencente ao gênero *Centropomus*, considerado moderno, ordem dos Perciformes, subordem Percoidei, superfamília Percoidae³ coletados através de linha e anzol no canal de Bertioga – SP/Brasil e mantidos nas instalações do ACQUA MUNDO – Aquário do Guarujá/Brasil, em tanques circulares com 1.000 litros de capacidade, aeração constante e troca de água a cada dois dias.

Procedimento experimental

Os animais foram anestesiados, por

meio de imersão em solução alcoólica de benzocaína 1:10.000^{15, 16}. Na região de pedúnculo caudal, acima da linha lateral no lado direito, foram inoculados 0,05mL da vacina BCG (Bacilo Calmette – Guerin) proveniente do Instituto Butantã – SP, na concentração de 8mg mL⁻¹. O grupo controle era composto por animais que não sofreram inoculação do BCG no tecido muscular. Após o procedimento, os animais foram devolvidos ao tanque, para recuperação do comportamento normal após 5 minutos. Seguindo a metodologia de Matushima⁶, foi realizada a coleta de material um, três, sete, 14, 21 e 33 dias após a inoculação. Para tanto os animais foram sacrificados em solução supersaturada de benzocaína e extraído fragmento de tecido muscular no local da inoculação utilizando-se lâmina de bisturi. O fragmento colhido foi imediatamente fixado em solução de formol a 10% para posterior preparo para análises histopatológica e imuno-histoquímica.

Histopatologia

O material coletado foi fixado por 24 horas, sendo posteriormente processado pelas técnicas histológicas usuais e corado pela técnica da hematoxilina-eosina (HE); sendo montados entre lâmina e lamínula.¹⁷

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

Imunohistoquímica

Após inclusão do material em parafina, foram obtidos cortes de cinco micrômetros de espessura. Estes foram montados em lâminas que continham filme de silano a 4% em acetona. Essas lâminas foram processadas e submetidas a reações com anticorpos primários para *Mycobacterium bovis* - BCG (Dako A/S Denmark), citoqueratina AE1/AE3 (Dako A/S Denmark) e proteína S100 (Dako A/S Denmark) na diluição de 1:10.000, 1:800 e 1:15.000, respectivamente.

Microscopia eletrônica

Fragmentos de tecido muscular coletados 14, 21 e 33 dias após inoculação foram fixados em glutaraldeído a 2% em tampão Milloning para posterior processamento e visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

Resultados

Histopatologia

Ao exame histopatológico, o grupo controle apresentou musculatura esquelética estriada normal com feixes musculares apresentando núcleos periféricos, com ausência de lesão tecidual ou infiltrado inflamatório.

Inicialmente, após 24h da inoculação do BCG, há processo inflamatório difuso com infiltrado moderado composto predominantemente por células mononucleares ao redor do inóculo, além da presença de edema intersticial e necrose tecidual (Figura 1A). Três dias após inoculação, observa-se formação de algumas células gigantes com posterior organização do foco lesional, com aumento de camadas de células ao redor do inóculo. Essas células apresentam amplo citoplasma acidófilo com inúmeros vacúolos, assemelhando-se à células epitelióides (Figura 1B). Após o 14º dia da inoculação havia maior organização da lesão em diversos granulomas. Até o 33º dia de inoculação não houve mudanças significantes no quadro reacional, apenas maior organização da lesão na forma de granuloma composto predominantemente por células epitelióides (Figura 1C).

Imunohistoquímica

Ao exame imuno-histoquímico para o BCG observou-se positividade nos fragmentos observados em todos os tempos, sendo difusa nos primeiros dias, tornando-se mais restrita ao interior dos granulomas nos tempos subseqüentes (Figura 1D). A reação imunohistoquímica para proteína S100 foi positiva nos fragmentos em todos os tempos, demonstrando a

presença de células macrofágicas no foco lesional (Figura 1E). Em contrapartida, a reação para citoqueratina foi negativa para AE1/AE3 até o sétimo dia após inoculação. A partir do 14º dia, apresentou-se positiva, demonstrando a diferenciação dos macrófagos em células epitelióides excretoras de citoqueratina (Figura 1F).

Ultra-estrutura

A ultra-estrutura das células epitelióides presentes na resposta inflamatória crônica desses animais, mostra a presença de junções desmossômicas entre as células adjacentes que compõe o granuloma (Figura 2).

Discussão

Espécies de peixes primitivos, implantes hormonais na cavidade peritoneal do bague do canal, *Ictalurus punctatus*¹⁰, BCG intramuscular em corydora, *Corydora nattereri*¹¹ e micobacteriose em “goldfish”, *Carassius auratus*¹³ verificou-se uma resposta inflamatória crônica difusa composta basicamente por células gigantes, sem formação de granuloma e diferenciação dos macrófagos em células epitelióides^{14, 18}, conseqüentemente negativas à expressão de citoqueratina.

Diferenças morfológicas e celulares se fazem presentes no decorrer do processo. Após 24 horas da inoculação do BCG, a fase aguda se caracteriza com uma reação inflamatória difusa composta por infiltrado inflamatório, edema intersticial e necrose tecidual, sendo essa fase inicial também verificada por Finn e Nielsen¹⁹, Timur, Roberts e McQueen²⁰, Matushima⁶ e Rego²¹.

A intensa reação inflamatória perivascular observada por diversos autores^{6,19,22}, também pôde ser observada no presente estudo, sugerindo a migração de células macrofágicas para o foco lesional. No decorrer do experimento, ocorrem mudanças na morfologia das células fagocíticas, como sua diferenciação em células com características epiteliais, as quais

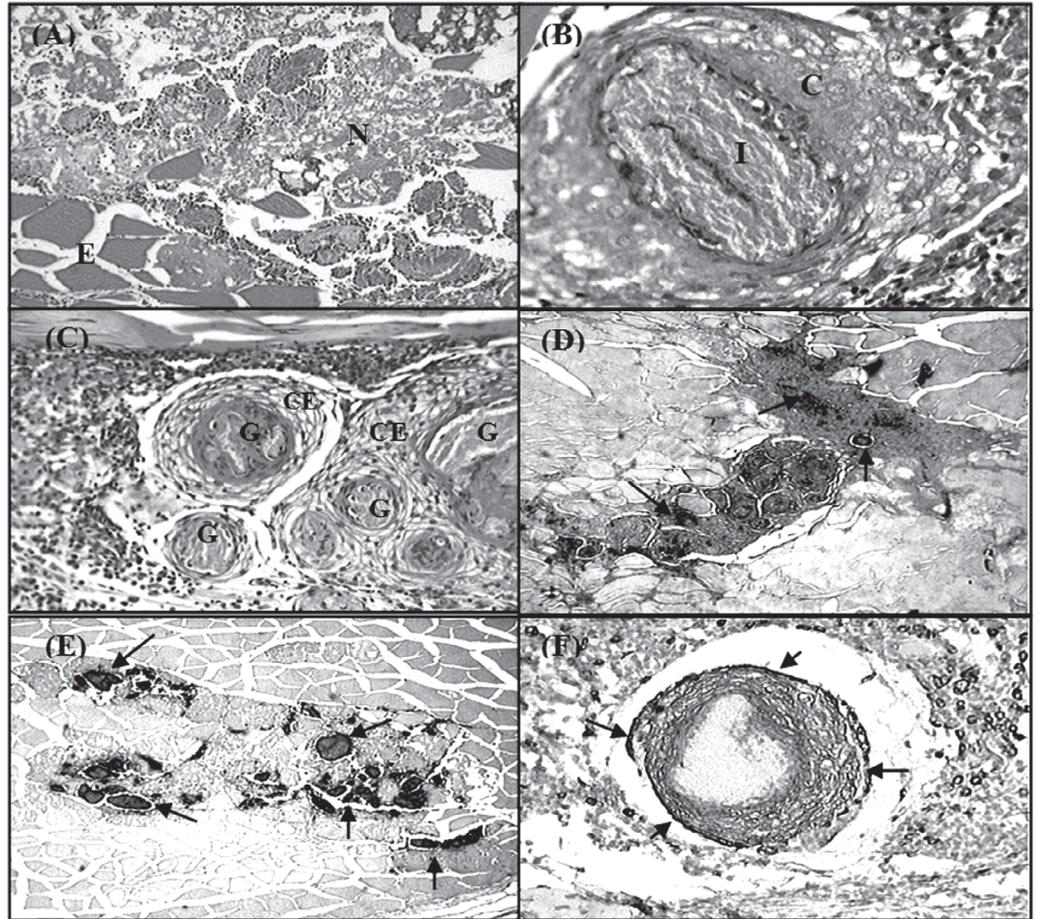


Figura 1 - (A) Tecido muscular de *Centropomus* sp., 24 horas após inoculação do BCG, infiltrado inflamatório moderado ao redor do inóculo, edema (E) e necrose tecidual (N), HE X 1000. (B) Tecido muscular de *Centropomus* sp., 7 dias pós-inoculação do BCG, formação de estrutura granulomatosa, possuindo no centro o inóculo (I), e na periferia camadas de células (C) com cromatina frouxa, e amplo citoplasma acidófilo e vacuolizado, HE X 4000. (C) Tecido muscular de *Centropomus* sp., 33 dias pós-inoculação, formação de diversos granulomas (G) compostos por células epitelióides (CE), contendo na região central, o BCG, HE X 2000. (D) Tecido muscular de *Centropomus* sp., 21 dias após inoculação. As setas indicam positividade para imunohistoquímica anti-BCG, ABC X 400. (E) Tecido muscular de *Centropomus* sp., setas indicam positividade para imunohistoquímica anti-proteína S100, ABC X 400. (F) Tecido muscular de *Centropomus* sp., setas indicam reação imunohistoquímica anti-AE1/AE3 positiva, ABC X 2000



Figura 2 - Eletromicrografia de tecido muscular de *Centropomus* sp. A seta mostra a presença de desmossomos entre as células adjacentes. x168.000

se organizam ao redor do inóculo, formando várias camadas à medida que o processo se cronifica. A presença de algumas células gigantes multinucleadas na resposta inflamatória do presente estudo, de peixes considerados filogeneticamente modernos pode ser um fenômeno ligado não só a posição filogenética do animal, mas também uma característica ligada à espécie, já que em linguados (*Pleuronectes platessa*) inoculados com carragenina²⁰ e tilápias (*Oreochromis niloticus*) inoculadas com BCG⁶, peixes classificados como modernos, também apresentam esse tipo celular durante a resposta inflamatória crônica, ao passo que em douradas, *Sparus aurata*, peixe também considerado filogeneticamente moderno não apresentam^{8, 18}.

No decorrer do processo inflamatório, há organização da lesão na forma de granuloma composto por células com cromatina frouxa, e amplo citoplasma vacuolizado sugestivas de serem epitelióides. Essas características também são encontradas em algumas espécies primitivas (salmonídeos) e demais espécies modernas.^{4,5,6,12,13,14,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27}

A positividade à reação imuno-histoquímica anti-BCG observada nos fragmentos de todos os tempos constituiu-se em padrão reacional semelhante aos encontrados por Radhakrishnan et al.²⁸, Matushima⁶, Carabias et al.²⁹ e Rego²¹.

Da mesma forma, a reação positiva para proteína S100 se desenvolveu desde o primeiro fragmento observado, tornando-se mais intensa no decorrer do tempo, corroborando Rego²¹, que observou o mesmo em peixes do gênero *Poecilia*, considerados filogeneticamente intermediários³, e em granulomas de mamíferos, formados por células epitelióides^{30, 31, 32}. Em contrapartida, a reação imuno-histoquímica para citoqueratina AE1/AE3 se mostrou positiva somente após o 14º dia da inoculação do BCG, tempo em que é possível observar células com características epitelióides por meio da histopatologia, fenômeno que vai se intensificando até o 33º dia. O resultado verificado em muito se assemelha ao encontrado por Noga, Wright e Pasarell²⁴ e

Matushima⁶ que observaram positividade para citoqueratina em peixes considerados filogeneticamente modernos.

A ultra-estrutura das células epitelióides demonstrou a presença de desmossomos. As mesmas características ultra-estruturais também foram observadas por Rego²¹ em peixes intermediários do gênero *Poecilia* (Molinsia), e Noga, Wright e Pasarell²⁴ e Matushima⁶ em peixes modernos (*Oreochromis niloticus*).

Pelo fato de peixes considerados primitivos, como a truta arco-íris¹⁹, “goldfish”^{13,25} apresentarem a formação de células epitelióides^{14,18}, essas espécies podem estar numa posição na escala filogenética próxima aos animais pertencentes ao grupo dos intermediários, começando assim, a apresentar algumas características desse grupo, mas não apresentando tamanha especialização celular a ponto de expressarem características morfológicas e funcionais de uma célula epitelial, como a presença de desmossomos entre células adjacentes e positividade à reação imuno-histoquímica para citoqueratina AE1/AE3 observados em algumas espécies intermediárias²¹ e espécies modernas, como a tilápia do Nilo⁶ e “striped bass”²¹, mas apenas características macrofágicas.

Conclusão

Há diferenças histológicas, histoquímicas e ultraestruturais na resposta inflamatória crônica em peixes pertencentes a diferentes posições filogenéticas, ou seja, primitivos, intermediários ou modernos. Sendo que, em peixes modernos, na formação de um granuloma imune, os macrófagos se diferenciam em células epitelióides, ao passo que em peixes primitivos, os macrófagos se diferenciam em gigantócitos, sem a formação de um granuloma.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade

de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, ACQUA MUNDO - Aquário do Guarujá, Faculdade de Medicina - USP, Instituto Butantã, Instituto Adolfo Lutz e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Histopathological, immunohistochemical, and ultra-structural evaluation of chronic inflammatory response of robalo (*Centropomus spp*) to BCG

Abstract

This study set out to evaluate inflammatory response kinetics after experimental inoculation with BCG in modern *Centropomus* sp. fish. BCG was applied through intramuscular injection in the caudal peduncular region, and samples were collected for analyses at days 1, 3, 7, 14, 21, and 33 post-injection. Acute phase inflammatory infiltrate was characterized by predominant mononuclear cells, interstitial edema, and muscular tissue necrosis. As the inflammatory response evolved, the lesion organized into a granuloma formed by epithelioid cells. These epithelioid cells were positive for the S100 protein and cytokeratin at histochemical analysis, which demonstrates macrophage and secretory activity, besides ultra-structural analysis showed desmosomic junctions within adjacent cells. It didn't have an expressive participation of giant cells and pigment containing cells in the inflammatory reaction, suggesting that it's a specie-specific characteristic.

Key words:

Fish.
Histopathology.
Inflammation.
Epithelioid cells.
Granuloma.

Referências

- GAUTHIER, D. T.; VOGELBEIN, W. K.; OTTINGER, C. A. Ultrastructure of *Mycobacterium marinum* granuloma in striped bass *Morone saxatilis*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 62, p. 121-132, 2004.
- METCHNIKOFF, E. **Lectures on the comparative pathology of inflammation**. New York: Dover Publication, 1968. 223 p.
- GOSLINE, W.A. **Functional morphology and classification of teleostean fishes**. Honolulu: The University Press of Hawaii, 1971. 208 p.
- CHINABUT,S.; LIMSUWAN, C.; CHANRATCHAKOOL, P. Mycobacteriosis in the snakehead, *Channa striatus* (Fowler). **Journal of Fish Diseases**, v. 13, n. 6, p. 531-535, 1990.
- HATAI, K. et al. *Mycobacterium* infection in pejerrey, *Odonthestes bonariensis* Cuvier & Valenciennes. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 4, p. 397-402, 1993.
- 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.
- COLORNI, A. et al. Histopathology of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) experimentally infected with *Mycobacterium marinum* and treated with streptomycin and garlic (*Allium sativum*) extract. **Aquaculture**, v. 160, n. 1-2, p. 1-17, 1998.
- RAMOS, P. Granulomatose visceral em dourada (*Sparus aurata* L.) de presumível etiologia micobacteriana. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 95, n. 536, p. 185-191, 2000.
- ABERNETH, C. S.; LUND, J. E. Mycobacteriosis in mountain whitefish (*Prosopium williamsoni*) from the Yakima River. **Journal of Wildlife Disease**, v. 14, n. 3, p. 333-336, 1978.
- GOODWIN, A. E.; GRIZZLE, J. M. Granulomatous inflammation and monstrous giant cells in response to intraperitoneal hormone implants in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 104, n. 2, p. 149-160, 1991.
- XAVIER, J. G.; MATUSHIMA, E. R. Estudo comparado do processo inflamatório em teleósteos: inflamação crônica induzida por BCG em *Corydora nattereri*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7. 1993, Caxambu. **Anais...** Caxambu: [s. n.], 1993. p. 22.
- GOMÉZ, S. Unusual morphopathological features in case of fish tuberculosis. **Journal of Fish Diseases**, v. 21, n. 3, p. 137-141, 1998.
- TALAAT, A. M. et al. Pathogenicity of *Mycobacterium smegmatis* to goldfish, *Carassius auratus*. **Veterinary Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 151-164, 1999.
- HOWARD, S. T.; BYRD, T. F. The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. **Microbes and**

- Infection**, v. 2, n. 15, p. 1845-1853, 2000.
- 15 WEDEMEYER, G. Stress of anesthesia with MS-222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of the Fisheries Research Board of Canadá**, v. 27, n. 5, p. 909-914, 1970.
- 16 FERREIRA, J. T. et al. Comparison of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater fish species. **The Progressive Fish Culturist**, v. 41, n. 3, p. 161-163, 1979.
- 17 LUNA, L. G. **Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts**. Maryland: Jhonson Printers, 1992. p. 88-312.
- 18 GOMÉZ, S. et al. Fish mycobacteriosis: morphopathological and immunocytochemical aspects. **Journal of Fish Diseases**, v. 16, n. 2, p. 137-141, 1993.
- 19 FINN, J. P.; NIELSEN, N. O. The inflammatory response of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, v. 3, p. 463-478, 1971.
- 20 TIMUR, M.; ROBERTS, R. J.; MCQUEEN, A. Carrageenin granuloma in the plaice (*Pleuronectes platessa*); a histopathological study of chronic inflammation in a teleost fish. **Journal of Comparative Pathology**, v. 87, n. 1, p. 89-96, 1977.
- 21 REGO, A. A. M. S. **Avaliação histológica, imunohistoquímica, ultraestrutural e filogenética da resposta inflamatória induzida experimentalmente pelo BCG em peixes do gênero Poecilia (Molinésia)**. 1999. 105f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- 22 NASH, K. A.; FLETCHER, T. C.; THOMSON, A. W. Migration of fish leucocytes in vitro: the effect of factors which may be involved in mediating inflammation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 12, n. 1-4, p. 83-92, 1986.
- 23 HEDRICK, R. P.; MCDOWELL, P.; GROFF, J. Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 23, n. 3, p. 391-395, 1987.
- 24 NOGA, E. J.; WRIGHT, J. F.; PASARELL, L. Chronic inflammatory cells with epithelial cell characteristics in teleost fishes. **Veterinary Pathology**, v. 26, n. 5, p. 429-437, 1989.
- 25 HUIZINGA, H. W.; NADAKAVUKAREN, M. J. Cellular response of goldfish, *Carassius auratus* (L.), to metacercariae of *Ribeiroia marini* (Faust & Hoffman, 1934). **Journal of Fish Diseases**, v. 20, n. 6, p. 401-408, 1997.
- 26 CHINABUT, S. Mycobacteriosis and Nocardiosis. In: WOO, P. T. K.; BRUNO, D. W. **Fish diseases and disorders**. London: CAB Publishing, 1999. v. 3, p. 319-340.
- 27 KENT, M. L. et al. *Ichthyophonus* and *Mycobacterium*-like bacterial infections in commercially-important rockfish, *Sebastes ssp.*, in the eastern North Pacific Ocean. **Journal of Fish Disease**, v. 24, n. 7, p. 427-431, 2001.
- 28 RADHAKRISHMAN, V. V. et al. Immunohistochemical demonstration of mycobacterial antigens in intracranial tuberculoma. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 29, n. 7, p. 641-644, 1991.
29. CARABIAS, E. et al. Evaluation of an immunohistochemical test with polyclonal antibodies raised against mycobacteria used in formalin-fixed tissue compared with mycobacterial specific culture. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 106, n. 3, p. 385-388, 1998.
- 30 FALK, S.; TAKESHITA, M.; STUTTE, H. J. Epithelioid granulomatosis with initial and predominant manifestation in spleen. Morphological and immunohistochemical analysis of six cases. **Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 414, n. 1, p. 69-76, 1988.
- 31 MULLER, H.; TAKESHITA, M. In situ immunophenotype of macrophages and lymphocytes in granuloma formation of tuberculous lymphadenitis in HIV infected and immunocompetent patients. **Research in Virology**, v. 142, n. 2-3, p. 159-172, 1991.
- 32 MOMOTANI, E. et al. Immunohistochemical distribution of S100 alpha-positive cells in bovine mycobacterial and non-mycobacterial granulomas. **Journal of Comparative Pathology**, v. 108, n. 3, p. 291-301, 1993.
- 33 GODWIN, A. E.; GRIZZLE, J. M. Granulomatous inflammation and monstrous giant cells in response to intraperitoneal hormone implants in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 104, n. 2, p. 149-160, 1991.