

Chronic granulomatous inflammation in teleost fish *Piaractus mesopotamicus*: histopathology model study

Inflamación crónica granulomatosa en el pez teleosteo *Piaractus mesopotamicus*: modelo de estudio histopatológico

Wilson G Manrique^{1,4*} Ph.D, Mayra AP Figueiredo² Ph.D, Marco AA Belo^{4,5} Ph.D,
Maurício L Martins³ Ph.D, Flávio R Moraes¹ Ph.D.

¹São Paulo State University – UNESP, Department of Veterinary Pathology, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n CEP 14884-900, Jaboticabal/SP - Brazil. São Paulo State University – UNESP. ²University of São Paulo, Department of Clinical Analysis, Toxicology and Food Science, Laboratory of Virology, Bloco S, 1º Andar, Av. do Café, s/n - CEP: 14040-903 – Ribeirão Preto, Brazil. ³Federal University of Santa Catarina - UFSC, Aquaculture Department – Aquatic Organisms Health Laboratory (AQUOS), Rod. Admar Gonzaga 1346, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil. ⁴Brazil University, Descalvado Campus, Department of Veterinary Pathology, Av. Hilário da Silva Passos, 950 – Parque Universitário Descalvado, CEP: 13690-970, São Paulo - Brazil. ⁵São Paulo State University – UNESP, Department of Preventive Veterinary Medicine, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n CEP 14884-900, Jaboticabal/SP - Brazil. *Correspondence: wilsongomezmanrique@yahoo.es

Received: November 2015; Accepted: August 2016.

ABSTRACT

Objective. This study evaluated the cell kinetic and formation of granuloma during chronic inflammation induced by Bacillus Calmette-Guérin (BCG) in the skeletal muscle of *Piaractus mesopotamicus*, as a histopathology model to study innate immunity. **Materials and methods.** Sixty fish were divided in two groups: BCG-inoculated and non-inoculated fish and the inflammatory response analyzed 3, 7, 14, 21 and 33 days post-inoculation (DPI) by histopathology after hematoxylin-eosin and Ziehl-Neelsen staining. **Results.** 3 DPI of BCG showed a diffuse inflammatory reaction mostly composed by mononuclear cells. The inflammation continued diffuse 7 DPI initiating the cellular organization surrounding the inoculum and have continued at 14 DPI with discrete presence of epithelioid-like type cells with acidophilic cytoplasm and floppy chromatin. Higher cellular organization (21 DPI) surrounding the granuloma with intense peripheral mononuclear inflammatory infiltrate and nevertheless, an increase in the number of fibroblasts and macrophage-like cells was observed. The inflammatory process became less diffuse 33 DPI with formation of small amount of granuloma surrounded by the same type of reaction found in bigger granuloma. Both the young and old granuloma presented typical characteristic around the inoculum composed by a layer of epithelioid-like type cells, besides macrophages, some lymphocytes and abundant fibroblasts. **Conclusions.** This study showed the feasibility in the use of pacu to study chronic granulomatous inflammatory response induced by BCG, characterized by changes in the kinetics of inflammatory cells in skeletal muscle classifying as immune-epithelioid type, similar to granulomatous inflammation caused by *M. marinum* in teleost fish.

Key words: BCG, granuloma, macrophage, mycobacterium, pacu (Source: CAB).

RESUMEN

Objetivo. Este estudio evaluó la cinética celular y la formación de granuloma durante la inflamación crónica inducida por el Bacilo Calmette-Guérin (BCG) en el músculo esquelético de *Piaractus mesopotamicus*, como modelo histopatológico para estudiar la inmunidad innata. **Materiales y métodos.** Sesenta peces fueron divididos en dos grupos: peces inoculados con BCG y no inoculados y la respuesta inflamatoria analizada en 3, 7, 14, 21 y 33 días post-inóculo (DPI) por medio del análisis histopatológico y tinciones de hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen. **Resultados.** 3 DPI de BCG se observó reacción inflamatoria difusa principalmente formada por infiltrado celular mononuclear. Al 7° DPI la inflamación continuaba difusa con inicio de organización celular alrededor del inóculo, que se observó hasta el 14° DPI con discreta presencia de células de tipo epitelioides con citoplasma acidófilo y cromatina laxa. Para el 21° DPI se observó alta organización celular alrededor del granuloma con intenso infiltrado mononuclear periférico e incremento en el número de fibroblastos y macrófagos. El proceso inflamatorio se tornó menos difuso a los 33 DPI con formación de pequeños granulomas contenidos dentro de uno más grande. Los granulomas formados más rápidamente así como los formados tardíamente, presentaron características típicas alrededor del inóculo compuesta por una camada de células tipo epitelioides, macrófagos, linfocitos y fibroblastos. **Conclusiones.** Este estudio mostró la viabilidad del uso del *P. mesopotamicus* para estudiar la respuesta inflamatoria crónica granulomatosa inducida con BCG, caracterizado por la evolución de la cinética de células inflamatorias en el músculo esquelético clasificándolo como de tipo inmune-epitelioide, similar a la inflamación granulomatosa causada por *M. marinum* en peces teleosteos.

Palabras clave: BCG, granuloma, macrófago, micobacteria, pacu (*Fuente: CAB*).

INTRODUCTION

The mycobacteriosis is the common occurrence in many fish species, involvement of more than one species of *Mycobacterium* in fish infections, ranging manifestation of disease, although typically including granuloma formation (1) with potential for zoonotic transmission (2).

It is characterized by the formation of a granuloma with typical acid-alcohol resistant bacillus (BAAR) after staining with Ziehl-Neelsen (3). Due to its infectivity, the lack of details for host selection and environmental ubiquity including water, soil, dust, aerosol, and from animals (4). Mycobacteriosis is an emerging disease and also one of the most important chronic infectious diseases in the aquaculture/ornamental fish (5).

The disease develops from the chronic situation until the formation of a granuloma, it is associated with low mortality and can remain asymptomatic for a long time, causing damages on fish growth that become non marketable, and in acute cases all fish can be lost (6).

The granuloma is a focal compact collection of inflammatory cells with predominance of mononuclear cells and is generally formed as a result of a persistence of some product non degradable with active hypersensitivity (7, 8). This formation consists in a final result of a complex interaction among the invader organism/antigen, chemical products, drugs or

INTRODUCCIÓN

La micobacteriosis ocurre comúnmente en la mayoría de especies de peces, involucrando más de una especie de *Mycobacterium* en las infecciones, que manifiestan la enfermedad (incluyendo típicamente la formación de granulomas) (1) con potencial zoonótico (2).

Se caracteriza por la formación de granuloma con típicos bacilos ácido-acohol resistentes (BAAR) después de la coloración con Ziehl-Neelsen (3). Debido a su infectividad, la falta de datos para la selección del hospedero y su ubicuidad en el medio ambiente incluyendo el agua, suelo, polvo, aerosol y animales (4), la micobacteriosis es una enfermedad emergente y también una de las más importantes enfermedades infecciosas crónicas en la acuicultura/peces ornamentales (5).

La enfermedad se caracteriza a partir del momento crónico con la formación de granuloma, este es asociado con baja mortalidad y puede permanecer asintomático durante mucho tiempo, causando daños durante el crecimiento de peces tornándolos impropios para el comercio, en casos agudos todo el lote de peces puede morir (6).

El granuloma es una colección focal compacta de células inflamatorias con predominio de células mononucleares, que se forma generalmente como resultado de la persistencia de algún producto no degradable con hipersensibilidad activa (7,8). Esta formación consiste en un resultado final de una compleja interacción

other irritants, macrophage activity, response of Th1 helper cells, hyperactivity of B cells, circulating immune complexes and chemical and biological mediators (3, 4). Inflamed or immunological reactivity areas recruit monocytes in the blood (9) and these cells differentiate to macrophages after diapedesis (10) which merge to generate the multinucleated giant cells at site of inflammation, or differentiate in secreting macrophages known as epithelioid type cells (8, 11-13).

Mycobacteria have the capacity of delude the host immune defense (14, 15) and to survive inside the macrophages. Additionally, they can also present zoonotic risk (16). The use of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) is the unique vaccine against tuberculosis being one of the most used in the last 100 years worldwide (17).

Studies demonstrate that its use induce to a granuloma formation (8, 18) but is not constant and depends on the phylogenetic position of fish (19) also influenced by a great variety of fishes (20) in which becomes few clear the events involved in the process until the granuloma formation. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a neotropical freshwater species of great importance in South America finfish aquaculture, and this teleost fish has demonstrated to be a good bioindicator of water quality and has been used as model for ecotoxicity studies (21, 22). In this context, this study evaluated the cell kinetic and formation of granuloma during chronic inflammation induced by BCG in the skeletal muscle of pacus, as a model to study innate immunity.

MATERIAL AND METHODS

Animals and conditioning. Sixty healthy juvenile of pacus with mean weight 120 ± 5 g were randomly distributed in ten 250 L plastic tanks with water supplied from an artesian well at a flow of 1 L/min with supplementary aeration. They were fed commercial feed (3% of the biomass, 28% of GP and 4000 kcal of GE/kg). The parameters physical and chemical of the water were measured with a probe YSI Model MPS 556.

Experimental design. After acclimatized for seven days the fish were randomly distributed in two groups (BCG-inoculated and non-inoculated) 30 fish in each group. To evaluate the inflammatory process, five subgroups of six fish from each group were collected for analysis at 3, 7, 14, 21 and 33 days post-inoculation (DPI).

Induction of the inflammatory process. To the inoculum of BCG, the fish were anesthetized by

entre el organismo invasor/antígeno, productos químicos, drogas u otras sustancias irritantes, actividad de macrófagos, respuesta de linfocitos auxiliares Th1, hiperactividad de células B, complejos inmunes circulantes, mediadores químicos así como biológicos (3,4). El área inflamada o con reactividad inmunológica, recluta monocitos de la sangre (9), estas células se diferencian en macrófagos después de la diapedesis (10) que se fusionan para generar células gigantes multinucleadas en el sitio de la lesión o en macrófagos secretores conocidos como células tipo epitelioides (8, 11-13).

Las micobacterias tienen la capacidad de burlar la defensa inmune del hospedador (14,15) y de sobrevivir dentro de los macrófagos. Además, también pueden presentar un riesgo de zoonosis (16). El Bacilo Calmette-Guérin (BCG) es utilizado como vacuna contra la tuberculosis, siendo las más utilizadas en los últimos 100 años en todo el mundo (17).

Estudios demuestran que el uso de BCG en peces induce la formación de granulomas (8,18), siendo este inconstante, dependiendo del grado evolutivo en la escala filogenética del pez (19), factor también influenciado por variedad del pez (20) que caracterizan los diferentes eventos involucrados en el proceso hasta la formación del granuloma. El pacu (*Piaractus mesopotamicus*) es una especie de agua dulce neotropical de gran importancia en la acuicultura de América del Sur, este pez teleosteo ha demostrado ser un buen bioindicador de la calidad del agua y se ha utilizado como modelo para estudios ecotoxicológicos (21,22). En este contexto, este estudio evaluó la cinética celular y la formación de granuloma durante la inflamación crónica inducida por BCG en el músculo esquelético de pacus, como un modelo para estudiar la inmunidad innata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y acondicionamiento. Sesenta juveniles saludables de pacus con peso medio de 120 ± 5 g fueron distribuidos aleatoriamente en diez tanques plásticos de 250 L con flujo 1 L/min de agua de pozo profundo y suministro de aire. Fueron alimentados con ración comercial (3% de la biomasa, 28% of proteína bruta y 4000 kcal de GE/kg). Los parámetros fisicoquímicos de agua fueron medidos con la sonda multiparamétrica modelo YSI MPS 556.

Diseño experimental. Después de climatizar los peces durante siete días, fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos al azar (inoculados

immersion in an aqueous solution of benzocaine (1:10000 v/v) prediluted in alcohol (0.1 g/mL) and inoculated with 40 μ L of 2.2×10^6 colony forming unities (CFU)/mL of inactivated bacilli (BCG from Rio de Janeiro) using a syringe BD ULTRA-FINE™. The inoculum was made on the muscle tissue in the laterodorsal region, equidistant between the start of the dorsal fin and the midline. After procedure, they returned to their tanks, with continuous water flow and constant aeration. Non-inoculated fish were exposed to the same procedures but did not receive inoculation (Ethics Committee CEUA-UNESP protocol n° 020092/09).

Histopathology. After euthanasia in a benzocaine solution (1:500 v/v), fragments of the inoculated muscle were collected, fixed in formalin solution 10% buffered for posterior routine histological techniques and embedded in paraffin. Cross sections of 5 μ m thickness were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological examination and Ziehl-Neelsen (ZN) reagent to identify the bacillus. The slides were examined under microscope Olympus (BX 51) and the images captured with digital camera (Olympus DP73).

RESULTS

Histopathological analysis of HE stained slides of non-inoculated fish showed no signs of chronic inflammation as also confirmed after Ziehl-Neelsen staining. On the other hand, BCG-inoculated fish showed the bacilli presence (Figure 1). For evolution process study, inoculated fish showed a diffuse inflammatory reaction in the muscle 3 DPI mostly composed by

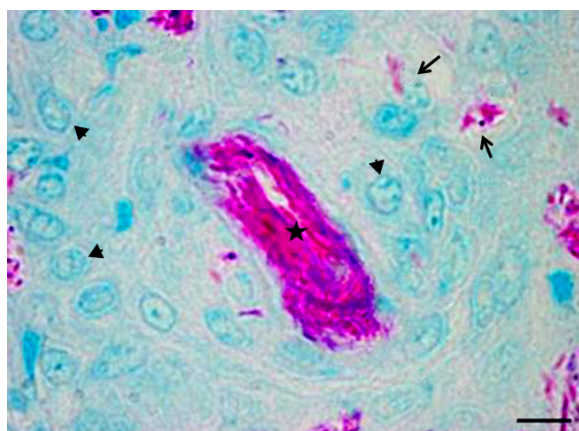


Figure 1. Photomicrograph of the muscle tissue of *Piaractus mesopotamicus*, fourteen days after inoculation of BCG. Can be seen macrophages (arrowhead) arranged around the inoculum (star), and phagocytosed bacilli (large arrow). (ZN). Scale bar = 6 μ m.

con BCG y no inoculados) 30 peces en cada grupo. Para evaluar el proceso inflamatorio, cinco subgrupos de seis peces en cada grupo fueron colectados para análisis en 3, 7, 14, 21 y 33 días post-inóculo (DPI).

Inducción del proceso inflamatorio. Para el inóculo de BCG, los peces fueron anestesiados por inmersión en solución acuosa de benzocaína (1:10000 v/v) pre-diluida en alcohol (0.1 g/mL) e inoculados con 40 μ L de 2.2×10^6 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL del bacilo inactivado (BCG cepa Rio de Janeiro) usando jeringas BD ULTRA-FINE™. El inóculo fue realizado en el tejido muscular esquelético, en la región latero dorsal, equidistante entre el comienzo de la aleta dorsal y la línea media. Después del procedimiento, fueron devueltos para los tanques, con flujo continuo de agua y aireación constante. En los peces no tratados (no inoculados con BCG) fue realizado el mismo procedimiento, utilizando el mismo vehículo sin BCG (Comité de ética CEUA-UNESP protocolo n° 020092/09).

Histopatología. Después de la eutanasia en solución de benzocaína (1:500 v/v) fragmentos de músculo inoculado fueron colectados, fijados en formol 10% tamponado para posteriormente ser incluidos en parafina. Cortes de 5 μ m de grosura fueron teñidos con hematoxilina-eosina (HE) para análisis histopatológico y Ziehl-Neelsen (ZN) para identificar el bacilo. Las láminas fueron examinadas en microscopio Olympus (BX 51) y las imágenes capturadas con cámara digital (Olympus DP73).

RESULTADOS

El análisis histopatológico con HE del grupo no inoculado, no reveló inflamación crónica o presencia de bacilos confirmado por la tinción de Ziehl-Neelsen. Por otra parte, en los peces inoculados fue comprobada la presencia de bacilos (Figura 1). Para el estudio del proceso inflamatorio, los peces inoculados mostraron una reacción inflamatoria difusa en el músculo 3 DPI formado en su mayoría por células mononucleares con cromatina densa y reducido citoplasma (Figura 2-a). También fueron observadas células gigantes multinucleadas con actividad fagocítica, algunos plasmocitos y presencia de pigmentos que podrían estar asociados con la lisis de eritrocitos; también fue observado edema intersticial caracterizado por la disociación de las fibras musculares (Figura 2 -b).

El proceso inflamatorio continuó difuso, y 7 DPI inició la organización celular que rodea el inóculo (Figura 2-c). El infiltrado mononuclear

mononuclear cells with dense chromatin and reduced cytoplasm (Figure 2-a). There were also observed multinucleated giant cells with phagocytic activity, some plasmocytes cells and pigments that might be associated with erythrocyte lysis, besides interstitial edema characterized by dissociation of the muscle fibers (Figure 2-b).

The inflammation continued diffuse 7 DPI initiating the cellular organization surrounding the inoculum (Figure 2-c). Mononuclear infiltrate was greater with the formation of the multinucleated giant cells, persistence of the interstitial edema and tissue necrosis. In the blood vessels the presence of mononuclear cells disposed close to the axial stream blood was observed besides foci of perivascular cell infiltrate containing dense chromatin nuclei and few cytoplasm. In the inflammatory infiltrate, brownish granules compatible with hemosiderin possibly derived from hemorrhage (Figure 2-d) was evidenced. Surrounding the inoculum fibroblast-like cells was found.

Interstitial edema with discrete presence of the multinucleated giant cells was found 14 DPI. The

fue mayor, con presencia de células gigantes multinucleadas, y persistencia de edema intersticial con necrosis del tejido. En los vasos sanguíneos se observó presencia de células mononucleares en organización axial, además de focos de infiltrado perivascular de células con cromatina densa y poco citoplasma. En el infiltrado inflamatorio, gránulos de color marrón compatibles con hemosiderina posiblemente provenientes de la hemorragia (Figura 2-d) fueron observados. Alrededor del inoculo también fueron observadas células compatibles con fibroblastos.

Edema intersticial con presencia discreta de las células gigantes multinucleadas fueron observadas 14 DPI. Los focos de necrosis no fueron más observados; el foco inflamatorio fue más organizado con presencia de infiltrado mononuclear, restos de pigmentos compatibles con hemosiderina y fibroblastos que rodean el inóculo. Fue observada morfología típica del granuloma con inóculo central, además del infiltrado de células mononucleares en la región periférica (Figura 2-e). La presencia discreta de células tipo epitelioides con citoplasma acidófilo y cromatina laxa, algunos linfocitos y una gran

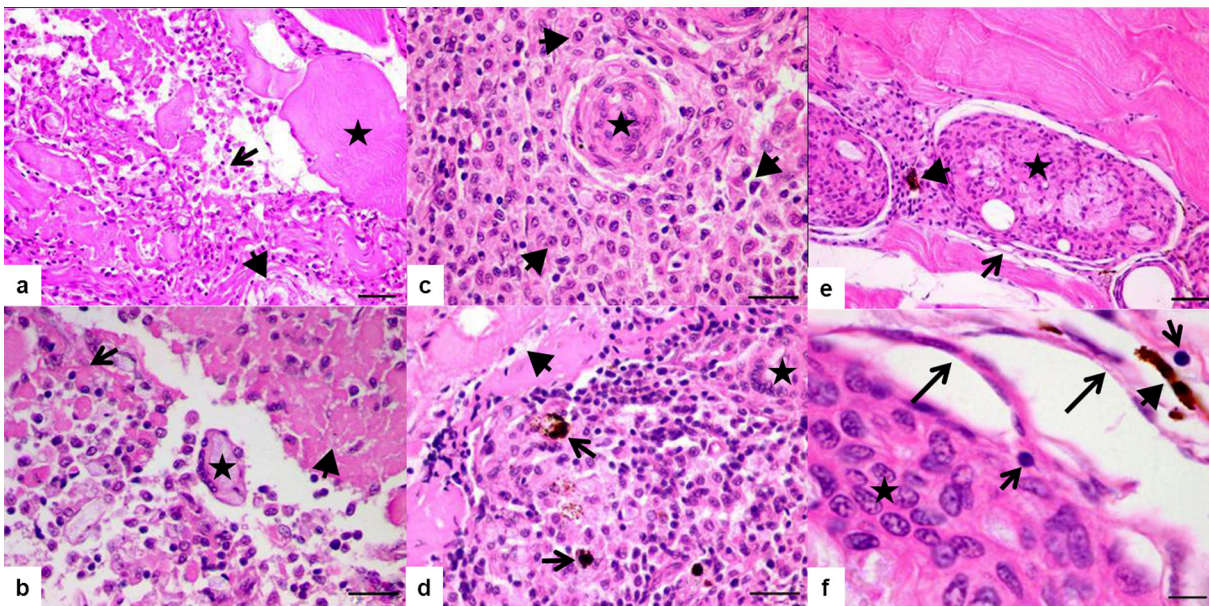


Figure 2. Photomicrographs of the muscle tissue *Piaraetus mesopotamicus*. **a)** Three days post-inoculation of BCG can be seen cellular infiltrated (large arrow), interstitial edema (arrowhead), muscle fibers (star). (HE). Scale bar = 30 μ m. **b)** Three days after inoculation of BCG can be seen multinucleated giant cells (star), tissue necrosis (arrowhead), interstitial edema (large arrow). (HE). Scale bar = 20 μ m. **c)** Seven days post-inoculation of BCG can be seen the beginning of granuloma formation with macrophages (star) and mononuclear cell infiltrate (arrowhead) (HE). Scale bar = 20 μ m. **d)** Seven days post-inoculation of BCG can be seen melanomacrophages (large arrow), multinucleated giant cells (star), edema (short arrow). (HE). Scale bar = 20 μ m. **e)** Fourteen days post-inoculation of BCG can be seen granuloma formation with central necrosis (star), presence of fibroblasts (large arrow), melanomacrophages (arrowhead). (HE). Scale bar = 30 μ m. **f)** Fourteen days post-inoculation of BCG can be seen granuloma formation with macrophages and epithelioid type cells (star), fibroblasts (large arrow), lymphocyte (short arrow), and melanomacrophages (arrowhead). (HE). Scale bar = 6 μ m.

foci of necrosis were not more visualized; the inflammatory focus was more organized with the presence of mononuclear infiltrate, pigment debris similar to hemosiderin indicating erythrocyte lysis and fibroblasts surrounding the inoculum. It was observed typical morphology of a granuloma with a central inoculum besides mononuclear cells infiltration in the peripheral region (Figure 2-e). Discrete presence of epithelioid-like type cells with acidophilic cytoplasm and floppy chromatin with the presence of some lymphocytes and great amount of fibroblasts was observed (Figure 2-f). It can be observed higher cellular organization surrounding the granuloma, intense peripheral mononuclear inflammatory infiltrate with the presence of hemosiderin pigments at 21 DPI with increase in the number of fibroblasts and macrophages cell surrounding the inoculum (Figure 3-a and 3-b).

cantidad de fibroblastos fueron observados (Figura 2-f). Se puede observar mayor organización celular alrededor del granuloma, intenso infiltrado mononuclear periférico con presencia de pigmentos de hemosiderina en 21 DPI, con aumento del número de fibroblastos y macrófagos alrededor do inoculo (Figura 3-a y 3-b).

A los 33 DPI el proceso inflamatorio se hizo menos difuso, incluso el infiltrado mononuclear y la formación de una pequeña cantidad de granulomas contenidos dentro de uno mayor (Figura 3 -c). Los granulomas menores y mayores presentaron características típicas, formados por una camada de células tipo epitelioides seguida por, macrófagos, linfocitos y abundante fibroblastos (Figura 3-d).

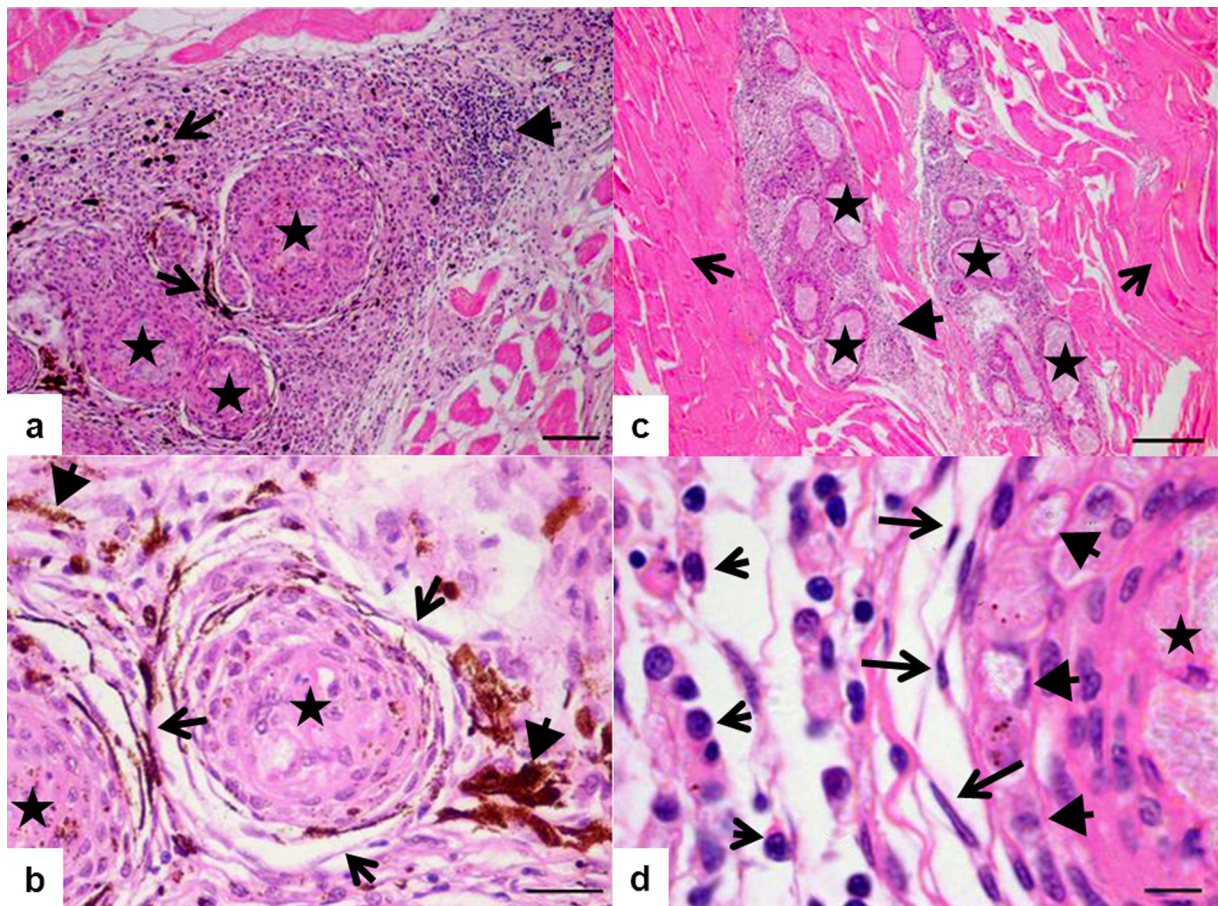


Figure 3. Photomicrographs of the muscle tissue *Piaractus mesopotamicus*. **a)** Twenty one days post-inoculation of BCG can be seen granuloma formation (star), mononuclear infiltrate (arrowhead), pigmentation associated with the presence of melanomacrophages (large arrow) (HE). Scale bar = 60 μ m. **b)** Twenty one days post-inoculation of BCG can be seen granuloma formation (star) with fibroblasts (arrowhead) and pigments of hemosiderin (short arrow) (HE). Scale bar = 20 μ m. **c)** Thirty three days post-inoculation of BCG can be seen granuloma formation (star) mononuclear infiltrate (arrowhead) and muscle fibers (large arrow) (HE). Scale bar = 200 μ m. **d)** Thirty three days post-inoculation of BCG can be seen the inoculum in the center of the granuloma (star), epithelioid type cells (arrowhead), fibroblast surrounding the macrophages layer (large arrow), macrophages (short arrow). (HE). Scale bar = 6 μ m.

At 33 DPI, the inflammatory process became less diffuse even presenting mononuclear infiltrate, formation of small amount of granuloma surrounded by the same type of reaction found in bigger granuloma (Figure 3-c). Both the young and old granuloma presented typical characteristic around the inoculum composed by a layer of epithelioid-like cells, besides macrophages, some lymphocytes and abundant fibroblasts (Figure 3-d).

DISCUSSION

The inflammatory process in pacus has initiated with intense perivascular reaction composed mostly by macrophages that had migrated to the lesion site, similar to that observed by Sado and Matushima (18). Over the course of time, it formed multinucleated giant cells as also described in *P. mesopotamicus* by Manrique et al (8). Contrarily, Ishikawa (23) did not observe giant cells 84 DPI with *Mycobacterium marinum* in *Oreochromis niloticus*. This difference could be in part attributed to the different bacterium strain used and fish species.

Epithelioid type cells were also found by Manrique et al (8) studying the granuloma formation in *P. mesopotamicus*, and these cells started to be observed in the 14th day of chronic granulomatous inflammation, confirmed by immunohistochemical staining. The great number of melanomacrophages observed in this study might be strongly related to the hemorrhage present in the muscular lesion. Consequently, these cells have phagocytosed the hemosiderin as a result of erythrocyte lysis, as described by Ramos et al (24) in visceral granuloma naturally diagnosed in cultured *Sparus aurata*. During granulomatous inflammation increased number and size of melanomacrophages were observed in the spleen of *O. niloticus* (25).

The granuloma formation was evident with organized macrophages disposed around the inoculum, epithelioid type cells and foreign body like giant cells at 33 DPI, corroborating previous studies in *Centropomus* spp. (18). Nevertheless, it was not found the formation of caseous center contrarily to that found in *Paralichthys orbignyanus* and *Elacatinus figaro* naturally infected by *M. marinum* (26).

Cellular staining of the granuloma herein observed developed according to Gauthier et al (27) description in *Morone saxatilis* experimentally infected with *M. marinum* where the macrophages with phagocytic activity have suffered morphophysiological changes and became transformed in epithelioid type cells with secreting activity. This feature will be maintained until the immune like granuloma as described by

DISCUSIÓN

El proceso inflamatorio en pacus inicia con intensa reacción perivascular compuesto en su mayoría por macrófagos que migraron al sitio de lesión, evento similar a lo observado por Sado y Matushima (18). En el transcurso del tiempo, se formaron células gigantes multinucleadas como también observado en *P. mesopotamicus* por Manrique et al (8). Por lo contrario, Ishikawa (23) no observó células gigantes 84 DPI en *Oreochromis niloticus* inoculados con *M. marinum*, esta diferencia podría atribuirse en parte a la bacteria utilizada y a la especie de pez.

Células tipo epitelioides también fueron encontrados por Manrique et al (8) cuando estudiaron la formación de granulomas en *P. mesopotamicus*; estas células comenzaron a ser observadas a partir de 14 días de la inflamación crónica granulomatosa, confirmada por estudio inmunogistoquímico. El alto número de melanomacrófagos observados en el presente estudio podría ser relacionado con la hemorragia presente en la lesión muscular. Consecuentemente estas células fagocitan la hemosiderina como resultado de la lisis de los eritrocitos, como fue descrito por Ramos et al (24) en el granuloma visceral diagnosticado naturalmente en cultivos de *Sparus aurata*. Durante la inflamación granulomatosa también fue observado aumento en número y tamaño de melanomacrófagos en el bazo de *Oreochromis niloticus* (25).

La formación de granulomas fue evidente con la organización de macrófagos dispuestos alrededor del inóculo, células tipo epitelioides y células gigantes 33 DPI, lo que corrobora estudios realizados en *Centropomus* spp. (18). Sin embargo, no fue observado formación caseosa, contrario a la descripción observada en *Paralichthys orbignyanus* y *Elacatinus figaro* naturalmente infectados con *M. marinum* (26).

La tinción celular del granuloma observado en este estudio siguió el padrón descrito por Gauthier et al (27) en *Morone saxatilis* infectados experimentalmente con *M. marinum*, donde los macrófagos con actividad fagocítica sufrieron cambios morfofisiológicos y se transformaron en células tipo epitelioides con actividad secretora. Esta característica mantiene el granuloma tipo inmune como descrito por Mariano (28). En conclusión, este estudio demostró la viabilidad de usar el *P. mesopotamicus* para estudiar la respuesta inflamatoria granulomatosa crónica inducida por BCG, caracterizado por los cambios en la cinética de células inflamatorias en el músculo esquelético clasificándolo como de

Mariano (28). In conclusion, this study showed the feasibility of using the *P. mesopotamicus* to study chronic granulomatous inflammatory response induced by BCG, characterized by changes in the kinetics of inflammatory cells in skeletal muscle classifying as immune-epithelioid type, similar to granulomatous inflammation caused by *M. marinum*.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this article.

Acknowledgements

The authors thank Research Support Foundation of the São Paulo State (FAPESP) (processes numbers 2009/17640-7 and 2010/08624-5); Ataulpho de Paiva Foundation for vaccine donation of vaccines.

tipo inmune epitelioides, similar a la inflamación granulomatosa causada por *M. marinum*.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses con respecto a la publicación de este artículo.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo" (FAPESP) (procesos números 2009/17640-7 y 2010/08624-5); "Fundação Ataulpho de Paiva" por la donación de las vacunas.

REFERENCES

- Whipps CM, Lieggi C, Wagner R. Mycobacteriosis in Zebrafish Colonies. *ILAR* 2012; 53(2):95-105.
- Waltzek TB, Cortés-Hinojosa G, Wellehan JF Jr, Gray GC. Marine mammal zoonoses: a review of disease manifestations. *Zoonoses Public Health* 2012; 59:521-535.
- Ulrichs T, Lefmann M, Reich M, Morawietz K, Roth A, Brinkmann V, et al. Modified immunohistological staining allows detection of Ziehl-Neelsen-negative *Mycobacterium tuberculosis* organisms and their precise localization in human tissue. *J Pathol* 2005; 205:633-640.
- Kazda J, Pavlik I, Falkinham JO. III, Hruska K. *The Ecology of Mycobacteria: Impact on Animal's and Human's Health*. 1ed., Netherlands: Springer; 2009.
- Jacobs JM, Stine CB, Baya AM, Kent ML. A review of mycobacteriosis in marine fish. *J Fish Dis* 2009; 32:119-130.
- Kent ML, Whipps CM, Matthews JL, Florio D, Watral V, Bishop-Stewart JK, et al. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2004; 138:383-390.
- Manrique WG, Claudiano GS, Figueiredo MAP, Petrillo TR, Marcusso PF, Gimeno EJ, et al. Lectin histochemical staining of granuloma induced by bacillus Calmette-Guérin in *Piaractus mesopotamicus*. *Rev MVZ Córdoba* 2013; 18(3):3753-3758.
- Manrique WG, da Silva Claudiano G, de Castro MP, Petrillo TR, Figueiredo MAP, de Andrade Belo MA, et al. Expression of cellular components in granulomatous inflammatory response in *Piaractus mesopotamicus* Model. *PLoS ONE* 2015; 10(3):e0121625.
- Belo MAA, Souza DGF, Faria VP, Prado EJR, Moraes FR, Onaka EM. Haematological response of curimbas *Prochilodus lineatus*, naturally infected with *Neoechinorhynchus curemai*. *J Fish Biol* 2013; 82:1403-1410.
- Belo MAA, Moraes FR, Yoshida L, Prado EJR, Moraes JRE, Soares VE, et al. Deleterious effects of low level of vitamin E and high stocking density on the hematology response of pacu, during chronic inflammatory reaction. *Aquaculture* 2014; 422-423: 124-128.

11. Belo MAA, Schalch SHC, Moraes FR, Soares VE, Otobon IA, Moraes JER. Effect of dietary supplementation with vitamin E and stocking density on macrophage recruitment and giant cell formation in the teleost fish, *Piaractus mesopotamicus*. J Comp Pathol 2005; 133:146-154.
12. Belo MAA, Moraes JRE, Soares VE, Martins ML, Brum CD, Moraes FR. Vitamin C and endogenous cortisol in foreign-body inflammatory response in pacus. Pesqui Agropecu Bras 2012; 47:1015-1021.
13. Sakabe R, Moraes FR, Belo MAA, Moraes JER, Pilarski F. Kinetics of chronic inflammation in Nile tilapia supplemented with essential fatty acids n-3 and n-6. Pesqui Agropecu Bras 2013; 48:313-319.
14. Onwueme KC, Vos CJ, Zurita J, Ferreras JA, Quadri LEN. The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. Prog Lipid Res 2005; 44:259-302.
15. Cambier CJ, Takaki KK, Larson RP, Hernandez RE, Tobin DM, Urdahl KB, et al. Mycobacteria manipulate macrophage recruitment through coordinated use of membrane lipids. Nature 2014; 505:218-222.
16. Haenen OLM, Evans JJ, Berthe F. Bacterial infections from aquatic species: potential for and prevention of contact zoonoses. Rev Sci Tech Off Int Epiz 2013; 32(2):497-507.
17. Andersen P, Kaufmann SH. Novel vaccination strategies against tuberculosis. Cold Spring Harb Perspect Med 2014; 2;4(6)pii: a018523.
18. Sado RY, Matushima ER. Histopathological, immunohistochemical, and ultra-structural evaluation of chronic inflammatory response of robalo (*Centropomus* spp.) to BCG. Braz J Vet Res Anim Sci 2007; 44:58-64.
19. Oksanen KE, Myllymäki H, Ahava MJ, Mäkinen L, Parikka M, Rämetsä M. DNA vaccination boosts Bacillus Calmette-Guérin protection against mycobacterial infection in zebrafish. Dev Comp Immunol 2016; 9:54(1):89-96.
20. Ishikawa CM, Matushima ER, Oliveira de Souza CW, Timenetsky J, Ranzani-Paiva MT. Micobacteriose em peixes. Bol Inst Pesca 2001; 27:231-242.
21. Castro MP, Moraes FR, Fujimoto RY, Cruz C, Belo MAA, Moraes JRE. Acute toxicity by water containing hexavalent or trivalent chromium in native Brazilian fish, *Piaractus mesopotamicus*: Anatomopathological alterations and mortality. Bull Environ Contam Toxicol 2014; 92:213-219.
22. Castro MP, Claudiano GS, Petrillo TR, Shimada MT, Belo MAA, Marzocchi-Machado CM, et al. Acute aerocystitis in Nile tilapia bred in net cages and supplemented with chromium carbochelate and *Saccharomyces cerevisiae*. Fish Shellfish Immunol 2014; 31:284-290.
23. Ishikawa CM. Quantificação bacteriana e avaliação das lesões em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo) inoculados experimentalmente com *Mycobacterium marinum* ATCC 927. São Paulo. Dissertação [Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses] – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 1998.
24. Ramos P. Visceral granuloma in sea bream (*Sparus aurata* L.) with presumptive etiology of mycobacteriosis. Rev Port Ci Vet 2000; 95(536):185-191.
25. Manrique WG, Claudiano GS, Petrillo TR, Castro MP, Figueiredo MAP, Belo MAA, et al. Response of splenic melanomacrophage centers of *Oreochromis niloticus* to inflammatory stimuli by BCG and foreign body. J Appl Ichthyol 2014; 30:1001-1006.
26. Romano LA, Sampaio LA, Tesser MB. Micobacteriose por *Mycobacterium marinum* em "linguado" *Paralichthys orbignyanus* e em "barber goby" *Elacatinus figaro*: diagnóstico histopatológico e imuno-histoquímico. Pesqui Vet Bras 2012; 32(3):254-258.
27. Gauthier DT, Rhode MW, Vogelbein WK, Kator H, Ottinger CA. Experimental mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. Dis Aquat Organ 2003; 54:105-117.
28. Mariano M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. Rev Inst Med Trop São Paulo 1995; 37:161-176.