

BLOQUEIO DE RECEPTORES β ADRENÉRGICOS ALTERA PARÂMETROS IMUNES EM UM MODELO DE ESTRESSE PSICOLÓGICO: COABITAÇÃO COM PARCEIRO DOENTE

MARGATHO, R.O.; CRUZ, D.G.; CALEFI, A.S.; LIMA, A.P.N.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; BORSOI, A.; MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J.

Faculdade de Medicina Veterinária-USP-São Paulo

Introdução: o sistema nervoso simpático (SNS) contribui para os efeitos relacionados ao estresse com a síntese de catecolaminas por meio de inervações simpáticas em tecidos linfóides. Já foi demonstrado que a coabitação com parceiros da mesma espécie portadores da forma ascítica do tumor de Ehrlich (T.A.E), determina um estresse psicológico, que provocou nos animais companheiros mudanças em parâmetros comportamentais e imunes. Tem sido demonstrado que os tumores produzem componentes orgânicos voláteis, que são liberados para a atmosfera pela urina, suor e respiração. Analisando-se esta vertente, foi aventada a hipótese de que os odores liberados pelas camundongas injetadas com o tumor seriam responsáveis pelas mudanças neuroimunes relatadas nos conspecificos saudáveis e que os roedores teriam a sua fisiologia e homeostase modificadas por esta estimulação olfativa aversiva. **Objetivos:** Estudar os efeitos do bloqueio de receptores β -adrenérgicos sobre parâmetros de imunidade inata em um modelo de estresse induzido pela coabitação (11 dias) com um parceiro inoculado com T.A.E. **Métodos:** 1- Formação dos grupos: Os experimentos foram realizados com 64 camundongas Swiss (7-9 semanas) divididas em quatro grupos iguais (oito/grupo). Uma camundonga em cada par no grupo controle foi tratada (i.p) com o veículo (dia experimental 1 - ED1) e a outra foi mantida intocável até ED6 e foi referida como CHP (companheiro de parceiro saudável). Entre ED6 e ED11 estes CHP foram tratados com veículo (CHP1) ou com propranolol (CHP2). Nos grupos experimentais, um animal por par de camundongos foi inoculado com 5×10^6 células de tumor de Ehrlich (i.p) e o outro animal não foi manipulado até ED6 e foi referido como CSP (companheiro do parceiro doente). Entre ED6 e ED11 os CSP foram tratados com veículo (CSP1) ou com propranolol (CSP2). 2- Fármacos: Propranolol -antagonista β -adrenérgico não seletivo diluído em solução de NaCl 0,9%; usado na dose 20 mg/kg/dia por via i.p. para avaliação por citometria de fluxo das células NK esplênicas e plasmáticas. 3- A quantificação da corticosterona sérica foi realizada por um kit de ELISA conforme as instruções do fabricante. 4- As glândulas foram retiradas cirurgicamente e pesadas em balança de precisão para a análise do peso relativo do órgão (peso glândula adrenal/peso total do animal). 5- ESTATÍSTICA: Na análise estatística foram consideradas significantes as análises com $p < 0,05$. **Resultados e conclusões:** foi demonstrada uma maior migração de células NK do sangue para o baço de companheiros do animal doente (CSP); este parâmetro foi revertido pelo pré-tratamento com propranolol. A administração de propranolol não interferiu com os níveis de corticosterona sérica e com o peso relativo das glândulas adrenais.

DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR MYCOBACTERIUM BOVIS EM RÃ-TOURO (LITHOBATES CATESBEIANA)

REISFELD, L.; SILVATTI, B.; IKUTA, C.; OLIVEIRA, G.; SOARES, J.; SALVAGNI, F.; ANDRÉ, F.; CATÃO-DIAS, J.L.

As micobactérias têm sido reconhecidas como uma fonte de morbidade e mortalidade em anfíbios. Até o presente, todos os casos descritos nestes animais foram de micobactérias atípicas. O presente trabalho descreve um caso de micobacteriose em *Lithobates catesbeiana* causado por *Mycobacterium bovis*. O animal era mantido em cativeiro há cinco anos, vindo a óbito sem a detecção de qualquer alteração clínica evidente. À necropsia, foi observada a presença de 5 ml de líquido translúcido de consistência viscosa na cavidade celomática. Macroscopicamente, pulmão, fígado, baço, intestino e rins apresentavam coloração enegrecida com presença de lesões nodulares multifocais, de aproximadamente 0,1-0,2 mm. Swabs de todos os órgãos acometidos foram realizados, acondicionados em meio de Stuart e encaminhados para exame microbiológico. Não foram observadas outras alterações macroscópicas, e fragmentos de todos os órgãos foram acondicionados em formol 10% e submetidos à realização de exame histopatológico. O exame citopatológico do líquido celomático evidenciou grande quantidade de material proteináceo, acompanhada por pequena quantidade de eritrócitos, raras células mononucleares, detritos celulares e escamas cutâneas, compatível com transudato modificado. A histopatologia revelou em pulmão, baço, intestino, fígado, pâncreas e rim a presença de múltiplos granulomas repletos por bacilos álcool-ácido resistentes (BAARS), evidenciados pela coloração de Ziehl-Neelsen. Notou-se também congestão difusa, focos de hemorragia, extensas áreas de necrose e hiperplasia dos centros de melanomacrófagos. O resultado histopatológico foi compatível com micobacteriose. Para a tentativa de isolamento de micobactérias, uma amostra de swab dos órgãos foi tratada com cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%, semeada em Stonebrink e Löwenstein-Jensen e incubada a 37°C por 90 dias. Os BAARS isolados foram classificados como pertencentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e identificados como *Mycobacterium bovis*, pela técnica de PCR multiplex com base na combinação de iniciadores com regiões alvo, 16S rRNA e MTB70, e das regiões genômicas de diferença RD9 e RD12, respectivamente. Este trabalho apresenta o primeiro relato de infecção de anfíbios por um membro do complexo *M. tuberculosis*, especificamente por (*M. bovis*) e realça a existência de implicações sanitárias relevantes, uma vez que estes animais são comumente utilizados na alimentação humana.

VALORES DE REFERÊNCIA DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, C57BL/6, BALB/C E RATOS Wistar

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.; BELTRAN, J.S.O.; SILVA, G.B.; TSUJITA, M.; CARMO, L.S.; CRISMA, A.R.; FOCK, R.A.; BORELLI, P.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

O estabelecimento dos valores de referência hematológica e bioquímica clínica em animais de laboratório é de suma importância para a análise de alterações funcionais, no entanto, ainda há poucos dados disponíveis para diversos grupos de animais. O presente trabalho foi delineado para estabelecer os valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos em linhagens comuns de camundongos e ratos usados em experimentação animal. Os parâmetros avaliados foram: perfil sanguíneo (hemograma, reticulócitos e mielograma) e a bioquímica do soro (proteína total, albumina, glicose,

colesterol, triglicérides, cálcio e fósforo). Foram utilizados camundongos C57BL/6, BALB/C e Swiss Webster e ratos Wistar, machos de dois a três meses de idade. As amostras de sangue total foram obtidas por punção do plexo axilar dos animais anestesiados com xilazina (16 mg/kg) e ketamina (120 mg/kg) e recolhidas utilizando-se como anticoagulante (EDTA) a 10%. As amostras de sangue recolhidas sem anticoagulante foram usadas para a obtenção dos soros utilizados para determinação de níveis de colesterol total, triglicérides, glicose, albumina e total de proteína. A dosagem de hemoglobina, hematócrito e contagem total de eritrócitos e leucócitos foram efetuadas no analisador de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics). As dosagens de proteínas totais e albumina revelaram uma maior concentração dessas substâncias em ratos, bem como a contagem de leucócitos totais em relação às linhagens de camundongos. Os demais parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentaram diferenças significativas. No entanto, foi estabelecida uma variação normal dentro de cada espécie. Os resultados obtidos permitem a padronização dos intervalos de referência em animais criados em biotério, refletindo assim a condição esperada em roedores utilizados em pesquisas científicas. **Apoio financeiro:** CNPq; CAPES; FAPESP.

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS À TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS ORIUNDAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS (PROJETO EM ANDAMENTO)

XAVIER, P.¹; CORDEIRO, Y.¹; ROCHETTI, A.¹; FUKUMASU, H.¹.

1. Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP.

Introdução e objetivos: assim como em mulheres, as neoplasias mamárias representam o tipo mais frequente de câncer em cadelas. Esse tipo de neoplasia apresenta grande heterogeneidade celular o que torna complexa a sua classificação histopatológica, além de possivelmente ser o fator responsável pela grande diversidade de resposta aos tratamentos de eleição como exérese e quimioterapia. Recentemente tem sido estudado um grupo de células denominadas células-tronco cancerosas (CTCs), descritas como as principais responsáveis pelas falhas nas quimioterapias, formação de metástases e no aparecimento de recidivas tumorais, o que as torna um importante alvo para terapias específicas. Entretanto, alguns problemas são o seu isolamento e cultivo. Alguns estudos recentes realizaram indução do processo de transição epitélio-mesenquimal com a superexpressão de alguns fatores de transcrição como, Twist, Snail e ZEB, promovendo linhagens com capacidade de manutenção de características de CTCs. O presente trabalho foi delineado para a avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição associados à transição epitélio-mesenquimal em diferentes cultivos de células oriundas de neoplasias mamárias de cadelas, para futuramente ser utilizada a sua superexpressão como potencial indutor deste processo em cultivos celulares.

Material e métodos: quatro linhagens celulares foram caracterizadas quanto sua malignidade segundo o tempo de duplicação, cariótipo e expressão de marcadores como citoqueratina e vimentina. As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 1% MEGS, 0,5% de SFB e 1% de antibiótico. Ao ser atingido 80% de confluência tiveram seu RNA total extraído pelo reagente Trizol (Life Technologies). A quantidade e a qualidade do RNA total foram avaliadas (BioAnalyzer Agilent). A conversão de mRNA para cDNA foi realizada com o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) que será utilizado para análise de expressão gênica por Real-Time PCR dos fatores de transcrição (FT) ZEB1, ZEB2, STAT3 e Slug.

O FT que apresentar menor expressão nas quatro linhagens será escolhido para a técnica de transgenia para sua superexpressão. **Resultados:** Quatro linhagens celulares oriundas de neoplasias mamárias (020/14; 025/14, 028/14 e 030/14) já foram isoladas e caracterizadas em testes de cariótipo, tempo de duplicação e expressão de marcadores citoqueratina e vimentina. Além disso, já foi realizada a padronização da técnica de expressão gênica para os genes ZEB1 e ZEB2. **Conclusão:** Pela padronização dos primers, pode-se sugerir a existência de baixa expressão dos genes ZEB1 e ZEB2 nas quatro linhagens estudadas. Porém, ainda é necessária a realização de estudos de análise de expressão gênica para confirmação dos dados. **Apoio financeiro:** CNPq e CAPES.

ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE HIF1-A EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS (PROJETO EM ANDAMENTO)

CAMPOS, I.E.; BARRA, C.N.; PULZ, L.H.; STREFEZZI, R.F.

Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

Introdução e objetivos: a malignidade e o alto poder metastático são características dos mastocitomas cutâneos dos cães o que torna cada vez mais importante o estudo de indicadores prognósticos que norteiem pesquisas em busca de novos tratamentos. A hipóxia tumoral é um evento frequente em neoplasias malignas, capaz de alterar o microambiente por meio de modificações na expressão de gênica. Para contornar a baixa oxigenação celular, este conjunto de modificações poderá piorar ou melhorar o prognóstico da neoplasia. O aumento da expressão do HIF1- α (Fator Induzível por Hipóxia do tipo 1 alfa), que pode ser encontrado na sua forma ativa e em grande quantidade no tecido submetido à hipóxia, permite a sobrevivência da célula neoplásica em ambiente hostil. Este fator de transcrição interage com a sequência de DNA HRE (Elementos de Resposta à Hipóxia), codificando inúmeros genes envolvidos com a angiogênese, como os das metaloproteinases de matriz e de importantes fatores de crescimento, como o VEGF e angiopoetinas. Desse modo, o HIF1- α pode ser responsável por conferir nova vasculatura à massa tumoral. Muitas vezes, as capacidades metastática e tecidual também são potencializadas pelo HIF1- α , sendo este relacionado por muitos autores à malignidade tumoral. A alta prevalência de mastocitomas em cães requer estudos que confirmem a natureza promotora ou supressora deste fator transcricional. Por isso, o presente projeto foi delineado para avaliar a presença de HIF1- α em mastocitomas de cães utilizando a técnica de imuno-histoquímica, de modo a serem estabelecidas relações que permitam a verificação se o HIF1- α é um bom indicador prognóstico para esta neoplasia.

Material e métodos: as amostras de mastocitomas serão processadas de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina e os cortes histológicos serão corados pela hematoxilina e eosina para graduação das lesões e para processamento imuno-histoquímico. Este último será realizado com o anticorpo anti-HIF1- α (Abcam, ab463) e, para o controle negativo, a IgG de camundongo na mesma diluição. A quantificação das marcações será determinada pela porcentagem de células positivas em cinco campos de marcação intensa ("hot spots"). Os resultados serão comparados à graduação histopatológica, mortalidade em função do tumor e sobrevida. **Resultados preliminares:** a aplicação do anticorpo de acordo com as recomendações do fabricante ainda não apresentou resultados específicos e, por este motivo, encontram-se em teste novas variações do protocolo imuno-histoquímico.

Apoio financeiro: FAPESP (processos: 2013/13252-8 e 2014/06129-8).