

Latham N, Mason G. 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implication in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci* 86: 261 – 289.

M. Chorilli, D. C. Michelin, H. R.N. Salgado. 2007. Animais de laboratório: o camundongo.

Iturrian WB, Fink GB. 1968. Comparison of bedding material: habitat preference of pregnant mice and reproductive performance.

Daniel A Domer, Rebecca L Erickson, Joann M Petty, Valerie K Bergdall, and Judy M Hickman-Davis\*. 2012. Processing and Treatment of Corncob Bedding Affects Cage-Change Frequency for C57BL/6 Mice.

Kaliste-Korhonen, Satu Eskola Eila. 1999. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice.

Thorne PS, Ulanova K, Yin M, Cohn R, Ares SJ, Jar, Zeld DC. 2005. End toxin exposure is a risk factor for asthma: the National Survey of End toxin in United States Housing

Green AR, Watches CM, Dimmers TG, Clark JM, Xing H. 2008. Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia.

Kawakami K, Shimosaki S, Tongu M, Kobayashi Y, Nabika T, Nomura M, Yamada T. 2007. Evaluation of bedding and nesting materials for laboratory mice by preference tests.

Rosenbaum MD, VandeWoude S, Johnson TE. 2009. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment.

## ZINCO PREVINE COMPORTAMENTO DOENTIO INDUZIDO PELO LIPOPOLISSACARÍDEO APÓS DESAFIO ESTRESSOR EM RATOS

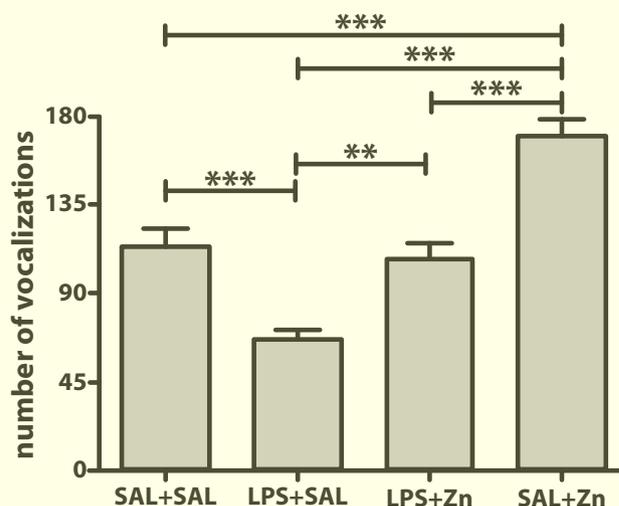
GALVÃO, M. C. <sup>1</sup>; REIS-SILVA, T. M. <sup>1</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. <sup>1</sup>; BERNARDI, M. M. <sup>2</sup>; KIRSTEN, T. B. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Email: mcg2804@gmail.com

<sup>2</sup> Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** O comportamento doentio (CD) é uma resposta comportamental e imune, específica e temporária, que ocorre em diversas espécies em diferentes processos inflamatórios/infecciosos [1-4]. É geralmente acompanhado por febre, prostração, diminuição da atividade exploratória, do comportamento social, alimentar e sexual, além de prejuízos cognitivos [1,5]. As alterações do CD são consideradas como estratégias orquestradas pelo hospedeiro para melhor lidar contra microorganismos invasores, cura rápida e redução da exposição do doente a predadores e contaminação de sua colônia [2,4]. Porém, o CD é considerado um estado motivacional modulado pelo contexto ambiental [6]. Por exemplo, se o animal estiver correndo risco de morte, ou engajado em lutas hierárquicas, o CD normalmente é momentaneamente interrompido para priorizar os comportamentos de luta ou fuga [6,7]. O lipopolissacarídeo (LPS) mimetiza infecções por bactérias Gram-negativas com a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$  e interleucinas - $1\beta$  e -6 [8,9], e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) [10], sendo considerado um potente indutor de CD [11]. O zinco regula os sistemas imune e nervoso, sendo, inclusive, prescrito para o tratamento de gripe, infecções respiratórias e pneumonia [12-14], embora sem preocupações com intercorrências estressoras. Considerando que o CD pode ser expresso de maneira diferente em situações estressoras, no presente trabalho o CD foi induzido em ratos com administração de LPS e subsequentemente os animais foram expostos ao desafio estressor por contenção. O objetivo do trabalho foi verificar os efeitos do tratamento com zinco no CD de ratos estressados. **Material e Métodos:** Foram utilizados quarenta ratos Wistar machos adultos (FMVZ-USP, Protocolo n°3130/2013) separados em quatro grupos (n = 10): (1) SAL+SAL, salina estéril (0,2 ml/100

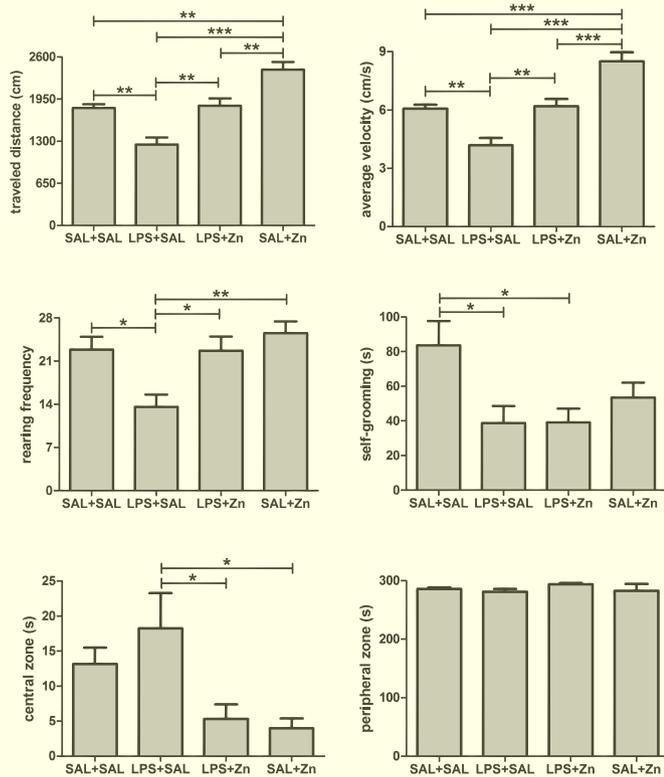
g, i.p.) e uma hora depois outra dose de salina s.c. na nuca. (2) LPS+SAL, LPS (0127:B8, 100  $\mu$ g/kg, i.p.) e uma hora depois salina (0,2 ml/100 g, s.c.). (3) LPS+Zn, LPS (100  $\mu$ g/kg, i.p.) e uma hora depois sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ , 2 mg/kg, s.c.). (4) SAL+Zn, salina (0,2 ml/100 g, i.p.) e uma hora depois zinco (2 mg/kg, s.c.). Após uma hora da segunda injeção, cada rato foi colocado em tubo de contenção para uma sessão de duas horas. Nos cinco minutos finais da contenção, cada rato foi observado para vocalizações ultrassônicas em frequência de 22-kHz (Ultravox, Noldus). Parâmetros avaliados por cinco minutos: número de vocalizações, e tempo total, máximo, médio e mínimo de vocalizações e de silêncio (em secs). Após o teste de vocalização os ratos foram inseridos em arena de campo aberto. Parâmetros avaliados por cinco minutos (Ethovision, Noldus): distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s), frequência de levantar, auto-limpeza (secs), e tempo (secs) nas zonas central e periféricas. Após o teste, o plasma foi obtido e utilizado para avaliar níveis de TNF- $\alpha$ , corticosterona, e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), usando-se kits de ELISA. Os dados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EP. Os resultados foram considerados significantes para  $p < 0,05$ . **Resultados:** Após o desafio estressor, o número de vocalizações de 22-kHz (Figura 1) dos ratos foi diminuído pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu a redução nas vocalizações, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) aumentou o número de vocalizações comparado aos valores dos três grupos. Os outros parâmetros de vocalizações ultrassônicas foram estatisticamente os mesmos entre os três grupos (dados não apresentados).



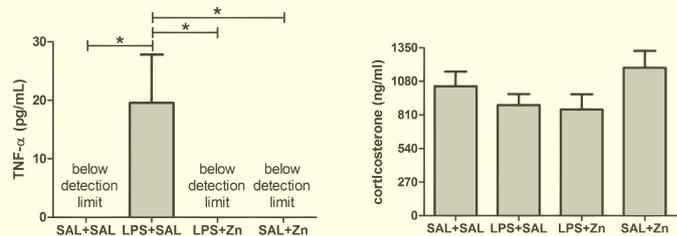
**Figura 1** - Efeitos do LPS (100  $\mu$ g/kg) e do zinco ( $ZnSO_4$ ; 2 mg/kg) no número de vocalizações de 22-kHz em ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois  $ZnSO_4$ ; e SAL+Zn, salina e uma hora depois  $ZnSO_4$  (n = 10 por grupo). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média  $\pm$  EP

Após o desafio estressor, à distância percorrida e a velocidade média (Figura 2) dos ratos foram diminuídas pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu essa redução, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) aumentou a distância percorrida e a velocidade média comparadas aos valores dos três grupos. A frequência de levantar (Figura 2) dos ratos foi diminuída pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu essa redução, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) não alterou o levantar comparando com os grupos SAL+SAL e LPS+Zn. A auto-limpeza (Figura 2) dos ratos foi diminuída pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com

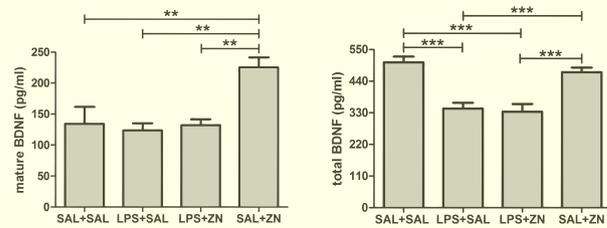
zincu com ou sem LPS (LPS+Zn e SAL+Zn) não impediu a redução da limpeza, resultando em resultados similares aqueles do grupo LPS+SAL. O tempo na zona central (Figura 2) dos ratos foi diminuído pelo zinco (LPS+Zn e SAL+Zn), comparado ao grupo LPS+SAL, mas não sem alterações para LPS+Zn e SAL+Zn versus SAL+SAL. Não foram verificadas diferenças para o tempo na zona periférica entre todos os grupos (Figura 2). Após o desafio estressor, os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 3) dos ratos foram aumentados pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). Como esperado, não foram detectados níveis de TNF- $\alpha$  nos animais não tratados com LPS (SAL+SAL e SAL+Zn). Interessantemente, o tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu a liberação de TNF- $\alpha$  no plasma, retornando aos mesmos valores que o grupo controle. Não foram verificadas diferenças para os níveis de corticosterona entre todos os grupos (Figura 3). Portanto, o eixo hipotálamo-pituitária- adrenal (HPA) parece não ter sido afetado pelos tratamentos. Após o desafio estressor, os níveis de BDNF maduro (Figura 4) dos ratos foram aumentados somente pelo zinco (grupo SAL+Zn), comparado aos dados dos outros três grupos. Os níveis de BDNF total (Figura 4) dos ratos foram diminuídos pelo LPS (grupos LPS+SAL e LPS+Zn), comparado aos dados do grupo controle; o zinco sem o LPS (SAL+Zn) resultou em valores semelhantes aqueles do grupo controle.



**Figura 2** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) na atividade geral em campo aberto em ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP



**Figura 3** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e corticosterona de ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP



**Figura 4** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) nos níveis plasmáticos de BDNF maduro e total de ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP

**Conclusões:** A administração de LPS induziu o CD em ratos mesmo após desafio estressor, verificado pela diminuição da atividade geral, da comunicação e do aumento nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ . O CD é considerado uma estratégia comportamental benéfica para melhor lidar com processos inflamatórios/infecciosos. Porém, em situações perigosas e estressantes o CD deve ser momentaneamente interrompido, para priorizar comportamentos ligados à sobrevivência, como a luta ou fuga. O tratamento com zinco foi capaz de prevenir o CD nos animais expostos ao LPS após o desafio estressor. Portanto, o tratamento com zinco foi benéfico para o animal doente melhorar sua resposta em situações de risco. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP no. 2012/07007-8 e temático no. 2009/51886-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Prêmio), e Universidade Paulista (UNIP no. 7-02-908/2014).

## Referências

- Larson SJ, Dunn AJ (2001) Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 15: 371-387.
- Hart BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12: 123-137.
- Yirmiya R, Weidenfeld J, Barak O, Avitsur R, Pollak Y, et al. (1999) The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. *Brain Res* 829: 28-38.
- Kent S, Bluthé RM, Kelley KW, Dantzer R (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13: 24-28.
- Dantzer R, Kelley KW (2007) Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 21: 153-160.
- Aubert A (1999) Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23: 1029-1036.
- Aubert A, Goodall G, Dantzer R, Gheusi G (1997) Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. *Brain Behav Immun* 11: 107-118.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Miyake K (2003) Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* 3: 119-128.

Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM (2013) LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 $\beta$  levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One* 8: e82244.

Bluthe RM, Walter V, Parnet P, Laye S, Lestage J, et al. (1994) Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III* 317: 499-503.

Maywald M, Rink L (2014) Zinc homeostasis and immunosenescence. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [in press].

Tuerk MJ, Fazel N (2009) Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 136-143.

Haase H, Overbeck S, Rink L (2008) Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: current status and future perspectives. *Experimental Gerontology* 43: 394-408.

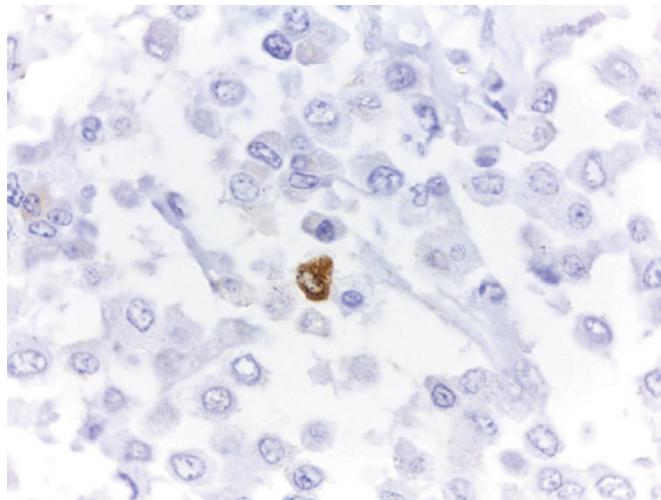
## EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS DE DIFERENTES GRAUS HISTOPATOLÓGICOS

MACEDO, B.M.<sup>1</sup>; BARRA, C.N.<sup>1,2</sup>; PULZ, L.H.<sup>1</sup>; KLEEB, S.R.<sup>3</sup>; XAVIER, J.G.<sup>3</sup>; NISHIYA, A.T.<sup>4</sup>; CATÃO-DIAS, J.L.<sup>2</sup>; FUKUMASU, H.<sup>1</sup>; STREFEZZI, R.F.<sup>1</sup>.

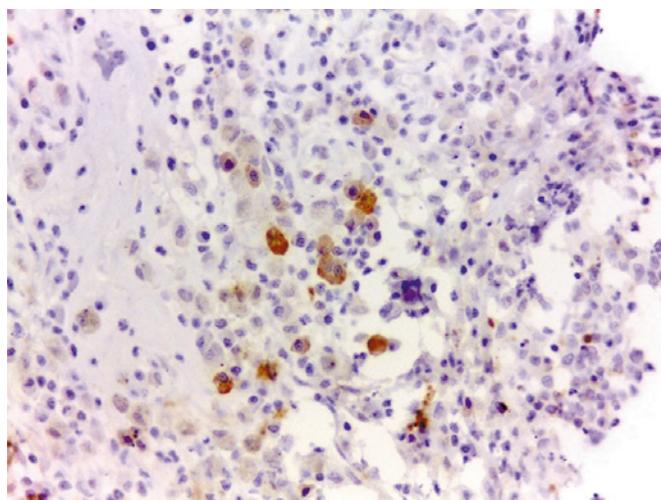
<sup>1</sup> Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, Brasil. <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup> Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. <sup>4</sup> Universidade Anhembi-Morumbi, São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** O mastocitoma, uma das neoplasias malignas de pele mais comuns dos cães, é normalmente classificado em três graus histológicos [1]. Recentemente, um novo método de classificação foi proposto, subdividindo estes tumores em apenas duas classes [2], com intuito de minimizar variações entre observadores, principalmente em relação aos tumores de grau II, e de tornar mais precisa a avaliação prognóstica para esta neoplasia. Semelhantemente, diversos outros métodos histomorfológicos e imuno-histoquímicos têm sido propostos no intuito de prever o comportamento desta neoplasia e melhorar os tratamentos disponíveis [3]. Sabe-se que para o desenvolvimento tumoral há necessidade de interação entre células e outros elementos teciduais, além de atividade proliferativa considerável e evasão da morte celular. A apoptose ocorre naturalmente em quase todos os tipos de células. A principal forma de ativação deste processo se dá pela via intrínseca, gerando o estímulo de morte por meio da formação de um complexo denominado apoptossomo. Este cliva caspases executoras, entre elas a caspase 3, desencadeando os eventos como a degradação e fragmentação nucleossomal. Alterações na expressão de caspase 3 podem ser consideradas como importantes para a progressão de tumores e para a resistência aos tratamentos [4]. Devido à sua importância na execução do processo de apoptose, a sua quantificação pode ser um importante marcador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. O objetivo desta pesquisa foi a caracterização da expressão imuno-histoquímica da caspase 3 em mastocitomas cutâneos caninos, e a verificação das possíveis relações com graduação histopatológica. **Materiais e Métodos:** Quarenta e oito amostras de mastocitomas cutâneos caninos provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), bem como de Hospitais e Clínicas Veterinárias colaboradoras foram processados rotineiramente para histopatologia. Cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina [5] para diagnóstico e graduação quanto à diferenciação celular, segundo os dois métodos de classificação mais utilizados [1,2]. Para as reações imuno-histoquímicas foi efetuada a incubação com o anticorpo primário anti-caspase 3 (policlonal de coelho anti-caspase 3 humana, Abcam, cód. ab4051), na diluição de 1:1500. As lâminas de controle negativo foram incubadas com IgG em substituição ao anticorpo primário e processadas simultaneamente para confirmar a especificidade dos anticorpos.

A imunomarcação para caspase 3 foi classificada, por 3 observadores simultâneos, em cinco campos de intensa marcação ("hot spots") como: negativa, para os tumores sem expressão da proteína; 1+, para lesões com até 1% de células neoplásicas marcadas; ou 2+, para expressão em mais de 1% das células tumorais, conforme realizado por outros [4]. Os resultados foram comparados aos três graus histopatológicos, por meio de ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido de pós-testes de Dunn, ou pelo teste Mann-Whitney, com nível de significância estabelecido em 5%. **Resultados:** Foi observada marcação citoplasmática, finamente granular, em células isoladas (Figura 1) ou em pequenos grupos celulares (Figura 2). A distribuição dos casos analisados em função dos escores de marcação para caspase 3 e classificação histopatológica estão descritos na Tabela 1.



**Figura 1** - Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo canino apresentando célula isolada positiva para caspase 3. Obj. 100x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris



**Figura 2** - Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo canino apresentando grupo de células positivas para caspase 3. Obj. 40x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris

**Tabela 1** - Distribuição dos casos analisados em função dos escores de marcação para caspase 3 e classificação histopatológica utilizada

Escore para caspase 3*	Patnaik et al. [1]				
	Grau I (n=8)	Grau II (n=28)	Grau III (n=12)	Baixo grau (n=28)	Alto grau (n=20)
0	4 (50,0%)	10 (35,7%)	8 (66,7%)	12 (42,9%)	10 (50,0%)
1+	1 (12,5%)	11 (39,3%)	4 (33,3%)	7 (25,0%)	9 (45,0%)
2+	3 (37,5%)	7 (25,0%)	0 (0,00%)	9 (32,1%)	1 (5,0%)

\* 0 = negativo; 1+ = até 1% de células marcadas; 2+ = mais de 1% de células marcadas

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes para