

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.

Bluth 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.

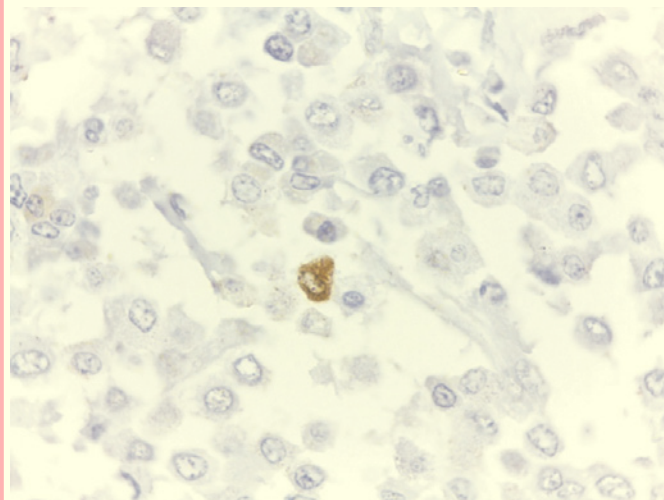
## EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS DE DIFERENTES GRAUS HISTOPATOLÓGICOS

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>.

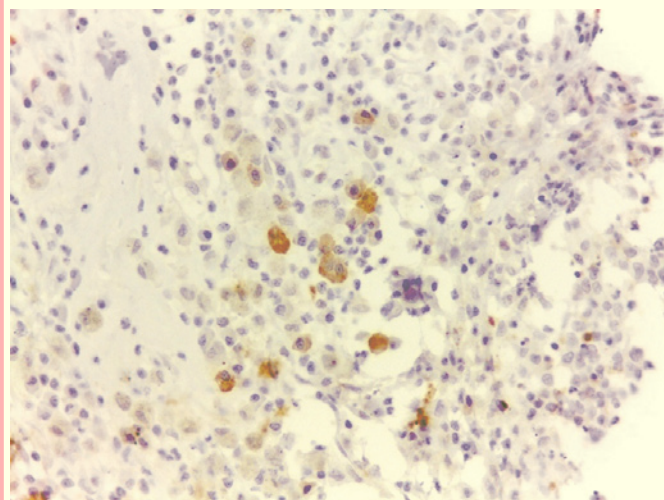
<sup>1</sup> Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, Brasil. <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup> Universidade 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

imunomarcção de caspase 3 entre os graus histopatológicos, tanto quando considerada a classificação de Patnaik e colaboradores [1] ( $p=0,1189$ ), como quando a de Kiupel e colaboradores [2] ( $p=0,2328$ ). Apesar disso, foi observada uma tendência dos tumores de maior grau apresentarem menor número de células positivas para caspase 3. O aumento do número de casos analisados, ou a utilização de outros métodos de quantificação das reações poderão trazer resultados mais consistentes a respeito. **Conclusão:** Os resultados do presente estudo apontam que os mastócitos neoplásicos cutâneos caninos expressam caspase 3 com frequência variável, mas sugerem a ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os graus histopatológicos desta neoplasia. **Agradecimentos:** à FAPESP (processo 2013/13252-8) e ao CNPq (PIBIC 382/2014).

#### Referências

PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEM, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Veterinary Pathology*, v. 21, n. 5, p. 469-474, 1984.

KIUPEL, M.; WEBSTER, J. D.; BAILEY, K. L.; BEST, S.; DELAY, J.; DETRISAC, C. J.; FITZGERALD, S. D.; GAMBLE, D.; GINN, P. E.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J.; HOWERTH, E. W.; JANOVITZ, E. B.; LANGOHR, I.; LENZ, S. D.; LIPSCOMB, T. P.; MILLER, M. A.; MISDORP, W.; MOROFF, S.; MULLANEY, T. P.; NEYENS, I.; O'TOOLE, D.; RAMOS-VARA, J.; SCASE, T. J.; SCHULMAN, F. Y.; SLEDGE, D.; SMEDLEY, R. C.; SMITH, K.; SNYDER, P. W.; SOUTHORN, E.; STEDMAN, N. L.; STEFICEK, B. A.; STROMBERG, P. C.; VALLI, V. E.; WEISBRODE, S. E.; YAGER, J.; HELLER, J.; MILLER, R. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 1, p. 147-155, 2011.

STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J. G.; CATAO-DIAS, J. L. Prognostic indicators for mast cell tumors - review. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 2, n. 2, p. 110-121, 2009.

SILVA, S. R.; BACCHI, M. M.; BACCHI, C. E.; OLIVEIRA, D. E. Human bcl-2 Expression, Cleaved Caspase3, and KSHV LANA-1 in Kaposi Sarcoma Lesions. *Anatomic Pathology*, v. 128, p. 794-802, 2007.

PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J. B.; SOBIN, L. H. Laboratory methods in histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 279 p.

### **AValiação DO POTENCIAL DESREGULADOR ENDÓCRINO DA ATRAZINA EM CAPRINOS MACHOS ADULTOS, RESULTADOS PARCIAIS. (PROJETO EM ANDAMENTO)**

FERREIRA, T. B.<sup>1</sup>; GOTARDO, A. T.<sup>2</sup>; GORNIK, S. L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FHOUniararas - Fundação Hermínio Ometto. Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 13607-339 Araras – SP, Brasil. Email: talita\_brasileiro@hotmail.com

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa de Toxicologia Veterinária (CEPTOX), Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, 13635-900, Pirassununga, Brasil.

**Introdução:** Nos últimos anos a constatação de que muitas substâncias produzidas para diferentes fins podem afetar o sistema endócrino dos animais é uma preocupação de grande importância toxicológica à medida que tais substâncias podem se tornar contaminantes ambientais. Por alterarem a homeostase de diferentes hormônios, tais substâncias passaram a ser chamadas de “desreguladores endócrinos” (DE). Um exemplo é a atrazina (ATR), herbicida, largamente utilizado na agricultura em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Assim, o presente trabalho foi delineado para avaliar o potencial DE da atrazina em caprinos machos. Para isto, os animais foram divididos em dois grupos; um experimental, que recebeu a atrazina (ATR, n=5), na dose de 7,5mg/kg/dia, via oral, por um período de 60 dias; e um grupo controle (CO, n=5), que não recebeu qualquer tratamento experimental. Quinzenalmente até o 60º dia experimental, foram realizadas as análises: hematológica, bioquímica e reprodutiva. Não foram observadas diferenças significativas entre os valores destes diferentes parâmetros entre os animais dos diferentes grupos. Contudo qualquer conclusão a respeito do efeito DE da ATR

em ruminantes neste momento seria precipitada, haja vista que o protocolo proposto para tal avaliação compreende um período experimental de até 120 dias, sendo os resultados aqui apresentados parciais obtidos até o 60º dia de experimento. **Introdução:** Nos últimos anos foi constatado que muitas substâncias produzidas para diferentes fins podem afetar o sistema endócrino dos animais e passaram a ser de grande importância toxicológica à medida que se tornam contaminantes ambientais. Por alterarem a homeostase de diferentes hormônios, estas substâncias tem sido chamadas de “desreguladores endócrinos” (DE) [1]. Neste sentido, alguns herbicidas, inseticidas e fungicidas já mostraram sua atividade DE, em roedores, anfíbios e peixes [2,3,4,5,6]. Há muito se tem ciência dos efeitos das substâncias DE sobre animais de laboratório, tais como roedores; porém uma busca na literatura deixa clara a ausência de estudos e de protocolos para avaliação de DEs em animais de produção como os ruminantes. A exposição a estes diversos DEs, sejam eles agentes terapêuticos e/ou produtos químicos contaminantes ambientais, pode ter grande impacto econômico na produção de ruminantes [7]. Um exemplo é a atrazina (ATR), um herbicida, largamente utilizado nas culturas de milho e cana-de-açúcar em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Atualmente sabe-se que a ATR é um DE [8]. Seus efeitos em roedores machos adultos revelaram alterações como: redução do número e da motilidade dos espermatozoides [8], retardo da maturação sexual, atrofia testicular e diminuição dos níveis de testosterona [9]. Assim, tendo em vista os riscos da exposição de ruminantes aos DEs o presente trabalho foi delineado para avaliar o potencial DE da atrazina em caprinos machos. Para isso foi empregado o protocolo para avaliação de possíveis DEs em ruminantes que vem sendo desenvolvido por este grupo de pesquisa [10]. **Materiais e métodos:** Foram utilizados bodes adultos (18 meses), da raça Pardo Alpina. Previamente os animais foram separados em dois grupos: um experimental, que recebeu a atrazina (ATR, n=5), na dose de 7,5mg/kg/dia, via oral, por um período de 60 dias; e um grupo controle (CO, n=5), que não recebeu qualquer tratamento experimental. Todos os animais tiveram a sua dieta complementada com cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.), ração comercial, suplementação mineral e água, *ad libitum*. Quinzenalmente, os animais foram pesados e clinicamente avaliados. Nos dias experimentais 0, 30 e 60, foi mensurado o perímetro escrotal e aferida a consistência testicular dos animais; posteriormente foi realizada a coleta do sêmen por eletroejaculação para monitoramento dos seus perfis espermáticos, as amostras de sêmen foram submetidas à avaliação computadorizada da motilidade espermática e análise de morfologia. Também nestas mesmas datas foi coletado o sangue dos animais para dosagem de enzimas e de componentes sanguíneos: proteína total, albumina, ureia, creatinina, aspartato amino transferase, gama glutamil transferase, leucócitos, eritrócitos, hemoglobina, plaquetas. **Resultados:** Não foi evidenciada nenhuma manifestação clínica característica da intoxicação pela ATR. Também não foi observada nenhuma alteração digna de nota referente a: frequências cardíaca e respiratória, temperatura corpórea, coloração de mucosas e ganho de peso em ambos os grupos. As dosagens enzimáticas e os componentes sanguíneos mostraram flutuações de algumas variáveis, porém esses valores permaneceram dentro dos limites normais para a espécie caprina. A avaliação andrológica realizada não revelou alterações estatisticamente significativas entre os grupos nas variáveis: consistência testicular e perímetro escrotal. Da mesma forma, também não foram observadas alterações na motilidade e morfologia espermática. Embora os resultados parciais obtidos até o presente não revelem qualquer efeito DE da ATR, espera-se que com a exposição dos animais por um período maior, bem como com as análises hormonais e histopatológicas a serem realizadas ao término do período experimental venha a ser obtida uma conclusão mais precisa sobre o potencial DE da ATR em ruminantes, sabendo que este herbicida é um DE clássico para roedores. **Conclusão:** Qualquer conclusão a respeito do efeito DE