

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.
- KIPEL, 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.¹; GOTARDO, A. T.²; GORNIK, S. L.²

¹ FHOUniararas - Fundação Hermínio Ometto. Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 13607-339 Araras - SP, Brasil. Email: talita_brasileiro@hotmail.com

² 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

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 até o 60º dia de experimento. Além disso, vale salientar que o presente estudo auxiliará no desenvolvimento do protocolo para avaliação DE em ruminantes o qual vem sendo elaborado por este laboratório. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Referências

- U.S. Environmental Protection Agency. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. U.S. Environmental Protection Agency, 630/R-96/012, 116 p, 1997.
- VINGGAARD, A.M.; HNIDA, C.; BREINHOLT, V.; LARSEN, J.C. Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicol. In Vitro*, v.14, p. 227-234, 2000.
- ROLLEROVÁ, E.E. Interaction of acetochlor with estrogen receptor in the rat uterus. Acetochlor—possible endocrinomodulator? *Gen. Physiol. Biophys.*, v.19, p.73-84, 2000.
- HAYES, T.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*); laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* V.111, p.568-575, 2003.
- THIBAUT, R.; PORTE, C. Effects of endocrine disruptors on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.92, p.485-494, 2004.
- GOAD, R.; GOAD, J.; ATIEH, B.; GUPTA, R. Carbofuran-Induced endocrine disruption in adult male rats. *Toxicol. Mech. Methods*, v.14, p.233-239, 2004
- RHIND SM, EVANS NP, BELLINGHAM M, SHARPE RM, COTINOT C, MANDON-PEPIN B, et al. Effects of environmental pollutants on the reproduction and welfare of ruminants. *Animal*, v.4 (7), p.1227-39, 2010.
- KNIEWALD, J.; JAKOMINIC, M.; TOMLJENOVIC, A.; SIMIC, B.; ROMAC, P.; VRANESIC, D., et al. Disorders of male rat reproductive tract under the influence of atrazine. *J Appl Toxicol*, v.20, p.61-68, 2000.
- VICTOR-COSTA AB, BANDEIRA SM, OLIVEIRA AG, MAHECHA GA, OLIVEIRA CA. Changes in testicular morphology and steroidogenesis in adult rats exposed to Atrazine. *Reprod Toxicol*, v.29(3), p.323-331, 2011.
- GOTARDO, A. T.; PAVANELLI, E.L.; CARVALHO, H.F.; LEMES, K.M.; ARRUDA, R.P.; KEMPINAS, W.G.; GORNIAK, S.L. Endocrine Disrupts Action in Ruminants: a Study of the Effects of Ipomoea Carnea in Adult Male Goats. *Small Ruminant Research*, v. 119, p. 81-87, 2014.

CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR INTRATUMORAL COMO POTENCIAL INDICADOR PROGNÓSTICO PARA MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS (PROJETO EM ANDAMENTO)

DANIEL, J.¹; BARRA, C.N.^{1,2}; PULZ, L.H.¹; KLEEB, S.R.³; XAVIER, J.G.³; NISHIYA, A.T.⁴; CATÃO-DIAS, J.L.²; FUKUMASU, H.¹; STREFEZZI, R.F.¹.

¹ Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil. E-mail: rstrefezzi@usp.br

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil.

³ Universidade Metodista de São Paulo, Rua Dom Jaime de Barros Câmara, 1000, CEP 09895-400, São Bernardo do Campo, SP, Brasil.

⁴ Universidade Anhembí-Morumbi, Rua Conselheiro Lafaiette, 64, CEP 03164-110, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução: O Mastocitoma, um dos tumores de pele mais comuns em cães, representa cerca de 25% de todas as neoplasias cutâneas malignas nestes animais. A alta frequência em raças originárias dos Bulldogs sugere a existência de uma predisposição hereditária [1,2,3,4]. A avaliação prognóstica

em casos de mastocitomas cutâneos caninos é realizada de acordo com a graduação proposta por Patnaik et al. [7] e ainda norteia a conduta da maioria dos médicos veterinários diante dessa neoplasia. No entanto, tal critério de classificação é considerado subjetivo [8], estimulando pesquisas com marcadores prognósticos complementares ou mais objetivos [3]. O microambiente tumoral é formado pela associação de componentes químicos e biológicos, como a vascularização do tecido e a matriz extracelular (MEC). Sabe-se que a interação entre células cancerosas e o microambiente pode promover o crescimento de um tumor e de protegê-lo do ataque imunológico [5]. A MEC é formada por diversas substâncias, como colágeno e elastina, algumas delas podem se ligar a fatores de crescimento durante a proliferação celular tumoral, limitando sua difusão. A angiogênese, também pode ser inibida ou estimulada de acordo com a composição da MEC. Enzimas como as metaloproteinases de matriz facilitam a invasão e, conseqüentemente, a disseminação e as metástases, por alterarem a estrutura do colágeno intersticial [6]. O presente trabalho foi delineado para investigar a existência de variações dos constituintes da MEC entre os diferentes graus histopatológicos de mastocitomas cutâneos caninos, considerando as duas propostas de graduação mais utilizadas [9,7]. **Materiais e métodos:** Foram utilizados 73 casos de mastocitomas cutâneos caninos, corados pelas técnicas de Tricrômio de Masson e Picrossírius, para identificação de colágeno e de Verhoeff, para elastina [10]. Das lâminas coradas pelo Tricrômio de Masson foram obtidas imagens de cinco campos intratumorais representativos em cada lâmina, à objetiva de 40x. Observadas em microscópio óptico com câmera digital de alta definição (Leica DM500 e ICCD50 HD) e software para captura de imagens (Leica LAS EZ). A área contendo colágeno em cada campo foi mensurada com a seleção dos tons de azul, utilizando-se o software ImageJ. A média dos cinco campos resultou no índice de colágeno. As lâminas coradas pela técnica de Verhoeff foram analisadas com a mesma metodologia. Para as lâminas coradas pela técnica de Picrossírius, foi utilizado o microscópio com luz polarizada com câmera digital (AxioImager. A2 e AxioCam MRc, Zeiss) e software para captura de imagens (AxioVision, versão 4.9.1, Zeiss). Foram obtidas três imagens intratumorais representativas da lâmina, à objetiva de 20x. Os tipos de colágeno (tipo I, em tons de amarelo-laranja-vermelho, ou III, em verde) estão sendo analisadas com software Image ProPlus (Media Cybernetics). As médias de porcentagem da área ocupadas por tipo de colágeno serão seus respectivos índices de colágeno. Para comparação entre índices de colágeno e elastina de cada amostra e os graus histopatológicos foram utilizados os testes de ANOVA/Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, com nível de significância de 5%, utilizando o software Graphpad Prism. **Resultados e Discussão:** Os resultados obtidos com as marcações com Tricrômio de Masson confirmaram a existência de diferenças significantes em relação à quantidade de colágeno entre os graus histopatológicos de Patnaik et al. [7] ($p=0,0012$), principalmente entre os graus II e III ($p<0,05$) e os graus I e III ($p<0,01$) (Figura 1).

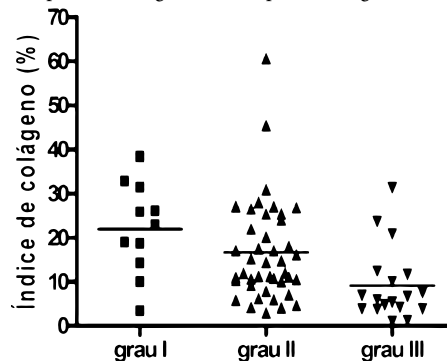


Figura 1 - Distribuição dos valores de índice de colágeno nas amostras de diferentes graus histopatológicos com base na classificação de Patnaik et al. (1984) e suas respectivas médias. ANOVA/Kruskal-Wallis, $p=0,0012$, com $p<0,05$ entre os graus II e III, e $p<0,01$ entre os graus I e III