

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.; GORNIK, S.L. Endocrine Disruptors 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 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).

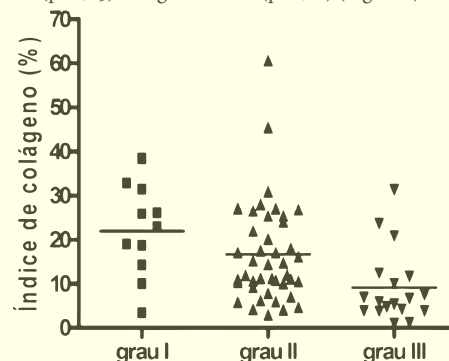


Figura 1 - Distribuição dos valores de índice de colágeno nas amostras de diferentes graus histopatológicos com base na classificação de Patnaik et al. (1984) e suas respectivas médias. ANOVA/Kruskal-Wallis, $p=0,0012$, com $p<0,05$ entre os graus II e III, e $p<0,01$ entre os graus I e III

De modo semelhante, quando são comparados aos graus propostos por Kiupel et al. [9], a análise estatística confirma a existência de diferenças extremamente significantes ($p < 0,0001$) quanto à área ocupada por colágeno entre os graus de malignidade do tumor (Figura 2), com menor quantidade de colágeno para os tumores de alto grau em relação aos classificados como de baixo grau.

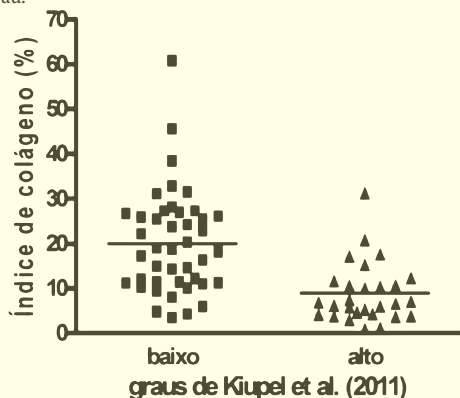


Figura 2 - Distribuição dos valores de índice de colágeno nas amostras de diferentes graus histopatológicos com base na classificação de Kiupel et al. (2011) e suas respectivas médias. Teste t, $p < 0,0001$ entre os grupos

O método de Picrossírius permitiu a visualização das fibras colágenas tipo I, mais espessas e birrefringentes com tonalidades laranja, amarelo e vermelho, bem como as fibras do tipo III, mais delicadas e dispersas, com birrefringência verde. Foi observada a presença de grande quantidade de fibras elásticas na pele normal e em artéria elástica, nos controles utilizados. Entretanto, as mesmas se apresentaram em mínimas proporções em mastocitomas cutâneos caninos. As quantificações destas marcações histoquímicas encontram-se em andamento em nosso laboratório. O colágeno, maior constituinte da MEC na pele íntegra, encontra-se diminuído em mastocitomas, sendo sua quantidade menor quanto maior o grau de malignidade desses tumores. Esta característica havia sido descrita por Patnaik et al. [7], mas não foi confirmada por análises quantitativas e qualitativas. Novas investigações são necessárias para a elucidação dos mecanismos de interação desses componentes. Pulz, 2014¹¹ verificou que a expressão de metaloproteinases de matriz e seus inibidores, particularmente a proteína TIMP-1, tem valor prognóstico nesta neoplasia. Sendo assim, a preservação e/ou a síntese de colágeno possuem potencial para se tornarem alvos terapêuticos para mastocitomas. A diferenciação entre os tipos de proteínas presentes na MEC também pode interferir na progressão tumoral, já que as metaloproteinases possuem especificidade por substrato. A elastina está presente em grande quantidade nos tecidos que requerem propriedades físicas de elasticidade como artérias e ligamentos e encontra-se também em menor quantidade na pele (SANTOS et al., 2004). Entretanto, foram encontradas quantidades mínimas de tal substância em fragmentos de pele de cães acometida por mastocitomas. Como controle positivo para a técnica de Verhoeff, foi realizada a coloração de cortes histológicos de artérias, onde é sabida a presença de fibras elásticas. A observação da elastina presente na pele íntegra revela a presença de uma quantidade superior à encontrada nos mastocitomas. Essa redução na proporção de elastina pode também estar relacionada com a progressão tumoral, porém não foi verificada tal associação, pois o processo de quantificação da mesma ainda está em andamento.

Conclusão: Mastocitomas de maior grau histopatológico apresentam menor quantidade de colágeno intratumoral, e a quantificação dessa proteína pode auxiliar na sua classificação. **Agradecimentos:** À FAPESP (processo 2013/13252-8) e Universidade de São Paulo (bolsa de IC RUSP 1903-2013). Aos técnicos Nilton Pedro dos Santos e Cláudio Arroyo, pelo auxílio técnico.

Referências Bibliográficas

- STREFEZZI, R. F.; KLEEB, S. R.; XAVIER, J.G.; J. L. CATÃO-DIAS. Avaliação da proliferação celular como indicador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 8, p. 559-565, 2010.
- RECH, R. R. Mastócitos em condições normais e Patológicas com ênfase em Mastocitomas de cães. Dissertação de mestrado, Santa Maria, RS, p.3-35 2010.
- THAMM, D.H.; VAIL, M.D. Mast Cell Tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEVEN, E. G. *Small Animal Clinical Oncology*. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, p.261-282. 2001.
- SANTOS, P. P. A.; FREITAS, V. S.; FREITAS, R. A.; PINTO, L. P.; SOUZA, L. B. Relationship between mast cells and T cells in inflammation, Review Article, *Odontol. Clín.-Cient.*, Recife, 9 (3) 215-217, jul/set., 2010.
- BISSELL, M. J. & RADISKY, D. Putting tumors in context. *Nat Vet Cancer*. 46-54. doi: 10.1038/35094059. 2001.
- LOCHTER, A., and M.J. BISSELL. Involvement of extracellular matrix in breast cancer. *Semin. Cancer Biol.* 6:165-173. 1995.
- 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.
- STREFEZZI, R. F.; XAVIER J. G. & CATÃO-DIAS J. L. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumors. *Vet Pathol*, p 268-275. 2003.
- 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.; HOWE RTH, E. W.; JANOVIK, 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.
- TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS Neto, A. G. *Manual de Técnicas para histologia normal e patológica*. 2.ed. Editora Manole, 2003.
- PULZ, L. H. Imunomarcagem de Metaloproteinase 2 e 9 e seus respectivos Inibidores Teciduais como potenciais Indicadores Prognósticos para Mastocitomas Cutâneos Caninos. Dissertação de Mestrado. FZEA-USP, São Paulo, 2014.

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO FATOR DE PLURIPOTÊNCIA OCT-4 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

VARGAS, T.H.M.¹; PULZ, L.H.²; BARRA, C.N.²; STREFEZZI, R.F.¹

¹ Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - Pirassununga/SP

² Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Introdução: Os mastocitomas caninos são neoplasias de grande importância para a clínica veterinária, tendo em vista a sua grande incidência na espécie, representando cerca de 20% dos tumores cutâneos caninos e até 30% dos casos malignos [1,2]. Para avaliação do grau de diferenciação celular e consequente malignidade do tumor, tem sido utilizado o grau histopatológico apresentando grandes diferenças de resultados entre patologistas devido a sua característica subjetiva [3]. Atualmente têm sido demonstrada a importância do emprego de instrumentos de prognósticas no tratamento das neoplasias. O Oct-4 está localizado no POU (Pit, Oct e Unc) é altamente expresso em células pluripotentes, sendo considerado como marcador de células-tronco. Está relacionado ao o grau de diferenciação celular em tumores de próstata em humanos⁴. Wen, et al 2013 relataram a existência de relação com tumores resistentes à quimioterapia e que o Oct-4 estava relacionado com quimioresistência. Já Saisuga et al, 2009 mostraram que a presença do Oct-4 estava relacionada com prognóstico pós-cirúrgico. A avaliação da presença de Oct-4 em células de mastocitomas caninos pode estar relacionada ao grau de malignidade do tumor, ou mesmo ser um fator prognóstico independente,