

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.

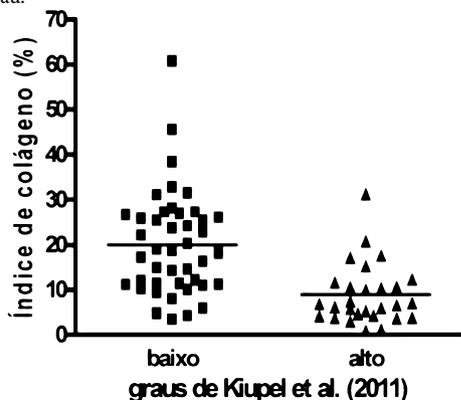


Figura 2 - Distribuição dos valores de índice de colágeno nas amostras de diferentes graus histopatológicos com base na classificação de Kiupel et al. (2011) e suas respectivas médias. Teste t, $p < 0,0001$ entre os grupos

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.; MISDORF, 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 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,

o que auxiliaria no tratamento da neoplasia. Portanto, o presente trabalho foi delineado para caracterizar a expressão de Oct-4 em células cancerosas de mastocitomas caninos, empregando a técnica de imuno-histoquímica e relacionando os resultados obtidos com a graduação histopatológica do tumor.

Materiais e Métodos: As amostras dos tumores, fixadas em formol a 10% e emblocadas em parafina, foram cortadas ao micrótomo, desparafinizadas em estufa e banhos de xilol. A re-hidratação foi realizada por banhos em álcool seriado e banho em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a solução de peróxido de hidrogênio diluído em álcool metílico à 3%, seguido de lavagem em PBS + tween. A recuperação dos antígenos foi efetuada com solução citrato pH 6,0 e aquecida em panela a vapor e em seguida foi realizada a lavagem em PBS. O bloqueio de antígenos inespecíficos foi efetuada com a solução de bloqueio Dako (Protein Block Serum-Free Ready-to-use). A incubação com anticorpo primário (Oct-3/4, na diluição de 1:50) foi realizada de acordo com orientações do fabricante. As amostras de controle negativo receberam IgG de camundongo, ao invés do anticorpo primário. Para incubação de anticorpo secundário foi utilizado o kit Dako (Advanced HRP, DakoCytomation) segundo as orientações do fabricante, seguido da aplicação do cromógeno DAB. A contracoloração foi realizada com Hematoxilina de Harris. Os tumores foram analisados de modo a ser caracterizado o padrão de marcação predominante, se nuclear e/ou citoplasmática, ou negativo para Oct-4. A análise estatística foi realizada agrupando-se os casos de duas maneiras: (1) considerando somente a marcação nuclear como positiva, e (2) considerando ambas as marcações, citoplasmática e nuclear, como positivas. Para comparar as marcações entre os graus de Kiupel et. al, 2011, foi utilizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. **Resultados:** Foram avaliadas 30 amostras de diferentes mastocitomas cutâneos caninos provenientes dos arquivos histopatológicos de hospitais veterinários colaboradores (FMVZ-USP, Universidade Anhembi-Morumbi e FZEA-USP). Houve grande diversidade nos resultados encontrados para marcação imuno-histoquímica de Oct-4. Dos 30 casos analisados, 13 amostras apresentaram marcação citoplasmática com alguns núcleos marcados (Figura 1A); quatro tiveram apenas marcação nuclear, sem marcação citoplasmática evidente (Figura 1B); sete amostras apresentaram apenas marcação citoplasmática, sem marcação nuclear evidente (Figura 1C); seis foram negativas e não tiveram marcação alguma (Figura 1D). O controle negativo não apresentou nenhum tipo de marcação, como pode ser visto na Figura 1E. Outro resultado interessante foi que algumas células da camada basal da epiderme, localização sabidamente comum para células-tronco [8], apresentaram marcação especificamente nuclear, como pode ser visto na figura 1F. Quando analisados pela classificação de Patnaik et al, 1984⁹ o número de tumores de grau I disponíveis para análise estatística foi muito reduzido (n=2), o que inviabilizou a realização da análise de variância. Mesmo assim, a comparação entre os graus II e III de [9] por meio de Teste t não revelou diferenças significantes (p>0,05). Na análise com base na classificação de Kiupel et al 2011⁷, também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes, tanto quando considerada apenas a marcação nuclear como positiva (p=0,4731), quanto quando foram consideradas positivas as marcações nuclear e citoplasmática (p=0,6283).

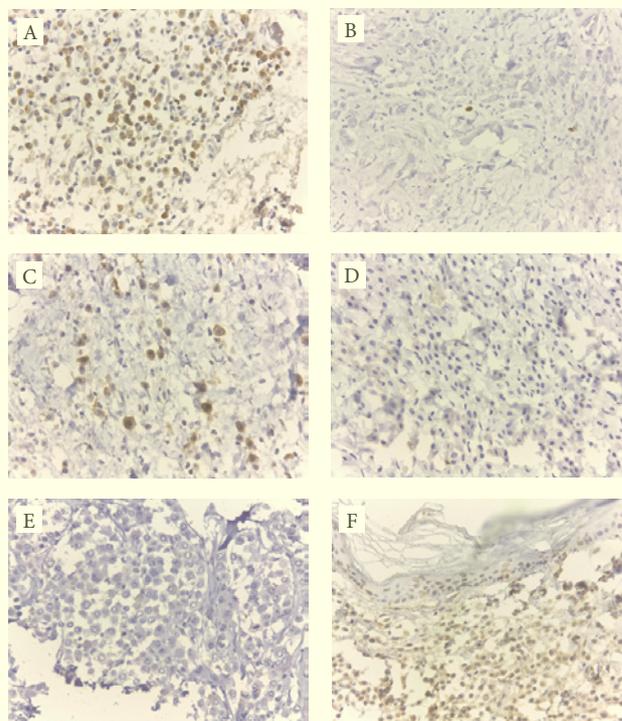


Figura 1 - Fotomicrografias de mastocitomas cutâneos caninos demonstrando: (A) presença de marcação citoplasmática predominante e alguns núcleos marcados, semelhante à grande maioria das amostras (amostra 97/14); (B) marcação específica de um único núcleo, sem evidente marcação citoplasmática ao redor (amostra 75/12); (C) marcação citoplasmática evidente, porém sem nenhum núcleo marcado (amostra 92/14); (D) ausência de marcação nuclear e citoplasmática (amostra 94/14); (E) ausência de marcação no controle negativo (amostra 24/14); e (F) presença de marcação das células da camada basal da epiderme (amostra 07/13). Contracoloração com Hematoxilina de Harris, obj. 40x

Conclusão: Não foram constatadas diferenças na imunomarcagem para Oct-4 entre os graus histopatológicos, para ambos os métodos de graduação. Porém, a presente análise deverá ser ampliada no futuro, principalmente para aumentar o número de casos de grau I. Foi obtida marcação considerada específica e satisfatória, com lâminas de controle negativo satisfatórias. Futuramente, torna-se necessária a avaliação de um maior número de casos, preferencialmente utilizando-se anticorpos específicos para Oct-4 e/ou para cada uma de suas isoformas, de modo a individualizá-las e eliminar a marcação concomitante de Oct-3. **Agradecimentos:** O presente trabalho recebeu auxílio financeiro do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). Agradeço a orientação do Prof^o Dr^o Ricardo de Francisco Strefezzi pela oportunidade e ensinamentos, às mestrandas Lidia Hildebrand Pulz e Camila Neri Barra pelo apoio e auxílio e a todos que trabalham no laboratório de patologia experimental da USP-FZEA que contribuíram com esta pesquisa.

Referências

- Hottendorf, G.H.; Nielsen, S.W. 1967. Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. Zentralbl. Veterinärmed A 14:272-281.
- Strefezzi, R.F.; Xavier, J.G.; Catão-Dias, J.L. 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. Vet. Pathol. 40:268-275.
- Northrup N.C., Howerth E.W., Harmon B.G., Brown C.A., Carmicheal K.P., Garcia A.P., Latimer K.S., Munday J.S., Rakich P.M., Richey L.J., Stedman N.L. & Gieger T.L. 2005. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. J. Vet. Diagn. Invest. 17:561-564.
- Gu, G.; Yuan, J.; Wills, M. Prostate Cancer Cells with Stem Cell Characteristics Reconstitute the Original Human Tumor In vivo. Cancer Res 2007;67:4807-4815. Published online May 17, 2007.
- Wen, K.; Fu, Z.; Wu, X.; Feng, J.; Chen, W.; Qian, J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: Effects associated with STAT3/Survivin. Cancer Letters xxx (2013) xxx-xxx.

Saisuga, S.; Tanaka, K.; Toiyama, Y.; Yokoe, T.; Okugawa, Y.; Ioue, Y.; Miki, C.; Kusunoki, M. Correlation of CD133, OCT4, and SOX2 in Rectal Cancer and Their Association with Distant Recurrence After Chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* (2009) 16:3488–3498 DOI 10.1245/s10434-009-0617-z.

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. J., Hendrick 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., Stefcicek B. A., Stromberg P. C., Valli V. E., Weisbrode S. E., Yager J., Heller J. and Miller R. Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior. *Vet Pathol* 2011 48: 147 originally published online 9 November 2010.

M.H. Tai, C.C. Chang, L.K. Olson e J.E. Trosko. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* vol.26 no.2 pp.495-502, 2005.

Patnaik A.K., Ehler W.J. & Macewem E.G. 1984. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21:469-474.

INICIAÇÃO CIENTÍFICA – MEDICINA VETERINÁRIA – RESUMOS PREMIADOS

ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENICA (EPEC) E PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE FEZES DE PSITACÍDEOS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZOOINÓTICO

¹REPLE, J. N.; ¹OLIVEIRA, M.C.V.; ¹OLIVEIRA, M.G.X.; ¹CUNHA, M.P.V.; ¹GIOIA-DI CHIACCHIO, R.M.; ¹SANCHES, L.A.; ¹SAIDENBERG, A.B.S.; ¹MORENO, L.Z.; ¹MORENO, A.M.; ¹KNÖBL, T.

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 05508-900 São Paulo-SP, Brasil. Email: tknobl@usp.br

Introdução e objetivos: A *Escherichia coli*, uma das principais habitantes do trato intestinal de seres humanos e das aves, pode ocasionar quadros entéricos nas duas espécies [1]. Drásticas mudanças ecológicas e comportamentais do ser humano, como aumento exponencial da população e intenso contato com pets exóticos, colaboraram para a emergência de zoonoses e prejuízos na própria saúde animal [2]. A bactéria, pertencente à família Enterobacteriaceae, pode ser classificada sorologicamente, filogeneticamente e molecularmente [3,4,5]. EPEC é um grupo de *E. coli* diarreioagênica que produz alterações características nas células intestinais, como a lesão A/E (*attaching and effacing*), mas não produz toxinas shiga, enterotoxina termolábil ou termoestável, sendo conhecida como uma das principais causadoras de diarreia infantil. As estirpes de EPEC ainda são classificadas em típicas quando abrigam o plasmídeo para o fator de aderência de EPEC (EAF), que codifica *bfp* (*bundle forming pili*), enquanto as estirpes atípicas são negativas para o gene *bfp* [6]. **A** *Escherichia coli* produtora de toxina shiga (STEC) também é um agente esporádico de diarreia, que secreta verocitotoxinas *stx1* e *stx2* e é igualmente apta a causar lesão A/E nas células intestinais [3]. Considerando o impacto zoonótico e a necessidade de conservação das aves silvestres e exóticas, o presente trabalho foi delineado para investigar a presença de grupos filogenéticos de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e produtoras de toxina Shiga (STEC) em estirpes isoladas de fezes de psitacídeos com o emprego da metodologia descrita por Clermont e colaboradores [4]. **Material e Métodos:** Foram coletadas fezes de 448 psitacídeos das espécies *Nymphicus hollandicus* (calopsita), *Agapornis* spp. (agapornis), *Melopsittacus undulatus* (periquito australiano), *Guaruba guarouba* (ararajuba), *Amazonas*

spp. (papagaio) e *Ara ararauna* (arara canindé), aparentemente saudáveis ao exame clínico. A coleta de material foi aprovada pelo Comitê de Ética e Uso Animal da FMVZ-USP (2984230514) e SISBIO: 43541-1. As amostras foram transportadas refrigeradas até o laboratório e processadas para isolamento e identificação de *Escherichia coli*. O cultivo foi realizado em caldo BHI, seguido de plaqueamento em ágar MacConkey a 37°C. As colônias foram confirmadas por série bioquímica e estocadas em meio Lúria Bertani. Como controles positivos dos testes foram utilizadas duas amostras de EPEC pertencentes ao sorogrupo O55, isoladas de crianças com diarreia, e como controle negativo uma cepa de *E. coli* K12. A extração de DNA foi realizada pelo método de Boom [7]. Quatro pares de *primers* foram utilizados na pesquisa de fatores de virulência dos patótipos diarreioagênicos EPEC (*eae*, *bfpA*, *stx1* e *stx2*), segundo a Costa et al. (2010) [8]. Os produtos da amplificação foram separados na eletroforese em gel de agarose 1,5% e corados com BlueGreen (Invitrogen®). Foi realizada a classificação entre os quatro principais grupos filogenéticos descritos por Clermont et al. (2000) (A, B1, B2 e D) [4], segundo a árvore de decisão dicotômica (Figura 1).

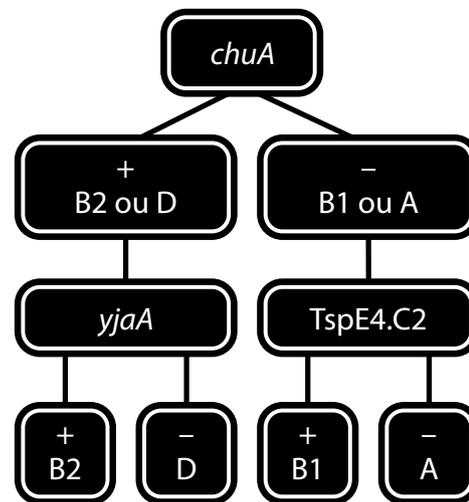


Figura 1 - Árvore de decisão dicotômica para determinação do grupo filogenético em amostras de *E. coli*, de acordo com os resultados de PCR para os genes *chuA*, *yjaA* e o fragmento de DNA TSPE4.C2 (adaptado de Clermont et al., 2000)

Resultados: Das 448 amostras de fezes coletadas, foram isoladas 151 colônias de *Escherichia coli*, totalizando um percentual de 33,7% de aves colonizadas (151/448). A Tabela 1 ilustra os resultados para as diferentes espécies de psitacídeos.

Tabela 1 - Resultados de cultura e PCR obtidos a partir de fezes de psitacídeos, São Paulo, 2014

Ave/Espécie	Tamanho da amostra (n)	Amostras + para <i>E. coli</i>	<i>eae</i>	<i>bfp</i>	<i>stx2</i>
Calopsitas (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	67	28/67	11/28	11/28	0/28
Agapornis (<i>Agapornis</i> spp.)	45	12/45	0/12	0/12	0/12
Periquitos Australianos (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	59	11/59	6/11	0/11	6/11
Papagaios (<i>Amazonas</i> spp.)	173	48/173	8/48	8/48	0/48
Araras (<i>Ara ararauna</i> / <i>Guaruba guarouba</i>)	104	52/104	2/52	0/52	0/52
Total	448	151	27	19	6

Os resultados obtidos indicaram uma elevada frequência de ocorrência de *Escherichia coli* positiva para os genes *eae* e *bfp* em calopsitas (39,3%). Trabulsi et al. (2002) [6] referem que, EPEC típicas são raramente isoladas de animais, sendo este patótipo encontrado majoritariamente em humanos. A presença de EPEC típicas nesses psitacídeos sugere a transmissão de caráter antroozoonótico como a mais provável. Knöbl et al. (2008) [9] analisaram diversos fatores de virulências em papagaios com sintomatologia