

MONITORAMENTO DE ESTIRPES VIRULENTAS DE *ARCOBACTER* SPP. EM JACARÉS (*CAIMAN YACARE*) DESTINADOS AO ABATE E CONSUMO

OLIVEIRA, MARIA GABRIELA XAVIER DE¹; PRESSINOTTI, LEANDRO NOGUEIRA³; CARVALHO, GIOVANE SPÍNOLA DE.³; OLIVEIRA, MIRELA CAROLINE VILELA¹; MORENO, LUISA ZANOLLI¹; MATAJIRA, CARLOS EMILIO CABRERA.¹; BERGAMO, ALESSANDRO SPÍNOLA³; ALEIXO, VICTOR MANUEL²; VEIGA, ALEXANDRE CAIXETA³; CORSINO, ELVIS DE SOUZA²; MORENO, ANDREA MICKE.¹; KNOBL, TEREZINHA¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (Avenida Professor Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - Cidade Universitária São Paulo - SP)

²Instituto Federal de Mato Grosso Campus Cáceres (Avenida dos Ramires s/nº - Distrito Industrial - Cáceres - MT (65) 3221-2600

³Universidade do Estado de Mato Grosso (Rod MT 358, KM 07)

Introdução e Objetivos: A exploração comercial de jacarés no Brasil tem considerável potencial econômico, e nos últimos anos se destacou pela capacidade de produção de carne e couro.[1] Visando a conservação ambiental e a possibilidade de produção de outras espécies animais para consumo humano, a criação de jacarés-do-pantanal (*Caiman yacare*) foi implantada recentemente na região do pantanal mato-grossense em sistema de produção fechada.[2] Contudo, são escassos os dados relativos ao manejo sanitário e a presença de possíveis patógenos nesta espécie animal. Os riscos relativos a esta cadeia de produção e o impacto na Saúde Pública ainda são pouco explorados.

Bactérias da família Campilobacteriaceae são responsáveis por provocar infecções alimentares em todo o mundo.[3] O gênero *Arcobacter* spp. é emergente e está relacionado à contaminação de produtos de origem animal.[4]

O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de espécies virulentas de *Arcobacter* spp. com potencial zoonótico nas fezes de jacarés cativos, destinados ao abate. **Materiais e Métodos:** Foram coletados 40 swabs de cloaca de jacarés-do-pantanal (*Caiman yacare*). O material foi homogeneizado em 2 mL de água peptonada e 1mL desse caldo foi semeado em 9 mL de meio Johnson Murano (JM),[5] agitados por 15 segundos. Os tubos foram incubados em aerobiose por 48 h. a 30°C. Após a incubação, uma alíquota de 10µL do caldo foi depositada sobre uma membrana estéril de celulose (0,45µm) e transferida para a superfície do ágar seletivo JM. Após uma hora, o filtro foi retirado e a placa foi estriada, incubada em aerobiose por 48 a 72 h. a 30°C.

As colônias com características de *Arcobacter* foram submetidas à identificação com a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e estocadas a -80°C. As espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* foram identificadas pela PCR e confirmadas pela técnica MALDI-TOF MS.

A pesquisa dos fatores de virulência adotou os procedimentos preconizados por Doudah et al.,[6] para amplificação de genes codificadores de adesão (*cadF* e *cj1349*), invasão (*ciaB*), fosfolipase (*pldA*), hemolisina (*tlyA*), gene regulador de proteínas de membrana externa associadas à captação de ferro (*irgA*), filamento de hemaglutinina (*hecA*), gene codificador de ativação de proteína hemolisina (*hecB*) e o marcador de virulência *mvIN*.

Resultados e Discussão: Os resultados da PCR e MALDI- TOF MS confirmaram 37,5% (15/40) amostras positivas para *A. butzleri* e 50% (20/40) *A. cryaerophilus*. Destaca-se ainda que 22,5% (9/40) das amostras foram positivas para o gênero *Arcobacter*, sem identificação da espécie. O gênero *Arcobacter* é composto por dezessete espécies, mas apenas as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são patogênicas para o homem e animais [7] Este trabalho relata, pela primeira vez, o isolamento de espécies patogênicas de *Arcobacter* em jacarés cativos. Estudos sobre a microbiota de animais vertebrados estão concentrados em mamíferos, o que dificulta a

diferenciação de agentes comensais e patogênicos em répteis [8]. Ramos et al. [9] analisando a microbiota entérica de jacarés, verificaram o predomínio de bactérias da família Enterobacteriaceae, com identificação dos gêneros *Citrobacter* spp. *Providencia* spp., *Escherichia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp. e *Edwardsiella* spp., além de bactérias não fermentadoras de açúcar: *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., *Acinetobacter* spp. e bactérias Gram positivas *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp. Até o presente momento não há relatos de literatura sobre o isolamento de bactérias da família Campylobacteriaceae nestes animais.

Para determinação do potencial zoonótico, os isolados foram submetidos à pesquisa de fatores de virulência que exercem importante papel na patogenicidade das infecções por *Arcobacter* spp. Obteve-se o seguinte resultado (Tabela 1):

Tabela 1 - Amostras positivas para fatores de virulência de *Arcobacter* spp.

Categoria	Gene	Amostras positivas
Adesão	<i>cadF</i>	38/40
	<i>cj1349</i>	38/40
Invasão	<i>ciaB</i>	38/40
Fosfolipase	<i>pldA</i>	39/40
Hemolisina	<i>tlyA</i>	38/40
Regulador de ferro	<i>irgA</i>	0/40
Hemaglutinina	<i>hecA</i>	21/40
Ativador de Hemolisina	<i>hecB</i>	16/40
Marcador de virulência	<i>mvIN</i>	40/40

Todos os isolados foram positivos para o marcador de virulência de *Arcobacter* spp (*mvIN*). A frequência de genes relacionados à adesão, invasão, hemolisina e fosfolipase variou de 95 a 100%. O gene de hemaglutinina foi detectado em 52,5% e o ativador de hemolisina em 40% dos isolados. Todos os isolados foram negativos para o gene codificador de ferro. Os mecanismos de virulência estudados já foram encontrados em estirpes de *Arcobacter* spp. isoladas de seres humanos que tiveram diarreia após consumirem alimentos de origem animal no Sul do Irã [10]. Novos estudos são necessários para determinar os fatores de risco desta cadeia produtiva, uma vez que a contaminação pode estar relacionada às características de recinto e hábito semi-aquático, ou ainda, à alimentação dos animais com vísceras de bovinos. **Conclusão:** A detecção das estirpes virulentas de *Arcobacter butzleri* e *Arcobacter cryaerophilus* em jacarés serve de alerta para produtores e consumidores, uma vez que se trata de um agente patogênico, emergente e capaz de causar toxi-infecções alimentares.

Apoio financeiro: Fapesp 2014/06584-7 e Capes.

Referências

- GONÇALVES, F. S.; VILELA, M. P. M.; BASSETTI, L. A. B.; VERDADE, L. M. **Manejo de Jacarés-de-Papo-Amarelo (*Caiman latirostris*) em Cativeiro.** São Paulo: Laboratório de Ecologia Animal, LPA/ESALQ/USP, 2015. p.1-18.
- AVEIRO, A. V. D. **Criação de jacaré em cativeiro (dossiê técnico).** Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT, 2012.
- VANDAMME, P.; DE LEY, J. Proposal of a new Family, Campylobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 451-455, 1991.
- SNELLING, W. J.; MATSUDA, M.; MOORE, J. E.; DOOLEY, J. S. G. Under the microscope: *Arcobacter*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p.7-14, 2006.
- JOHNSON, L. G.; MURANO, E. A. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. **Journal of Food Protection**, v. 62, n. 5, p. 456-462, 1999.

[6] DOUIDAH, L.; De ZUTTER, L.; VANDAMME, P.; HOUF, K. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *J. Microbiol. Methods*, v. 80, p. 281-286, 2010.

[7] NEWELL, D.G. *Campylobacters, Helicobacters* and Related organisms- Disease associations in pigs. *The Pig Journal*, v. 39, p. 102, 1997.

[8] KEENAN, S. W.; ENGEL, A. S.; ELSEY, R. M. The alligator gut microbiome and implications for archosaur symbioses. *Scientific Reports*, v. 3, p. 1-8, 2013.

[9] RAMOS, M. C. C.; MATUSHIMA, E. R.; VERDADE, L. M.; CARVALHO, V. M.; SANCHES, F. F. Microbiota bacteriana aeróbica oral de jacarés-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*): implicações no manejo em cativeiro. p. 33-42. In: WORKSHOP SOBRE CONSERVAÇÃO E MANEJO DO JACARÉ-DE-PAPO-AMARELO (*CAIMAN LATIROSTRIS*), 2., Piracicaba, 1992. *Anais*. 1992.

[10] TABATABAEI, M.; ASKI, H. S.; SHAYEG, H.; KHOSHBAKHT, R. Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*, v. 66, p. 1-4, 2014.

IMUNOMARCAÇÃO DE METALOPROTEINASE 2 E 9 E SEUS RESPECTIVOS INIBIDORES TECIDUAIS COMO POTENCIAIS INDICADORES PROGNÓSTICOS PARA MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

PULZ, LIDIA HILDEBRAND^{1,5}; BARRA, CAMILA NERI^{1,5}; KLEEB, SILVIA REGINA²; XAVIER, JOSÉ GUILHERME³; CATÃO-DIAS, JOSÉ LUIZ¹; SOBRAL, RENATA AFONSO⁴; FUKUMASU, HEIDGE⁵; STREFEZZI, RICARDO DE FRANCISCO⁵.

1 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

2 Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, Brasil.

3 Universidade Paulista, São Paulo, São Paulo, Brasil.

4 Onco Cane Veterinária, São Paulo, São Paulo, Brasil.

5 Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, São Paulo, Brasil.

Introdução e Objetivos: O mastocitoma cutâneo canino (MCT) apresenta comportamento biológico variável: alguns tumores demonstram características benignas, enquanto outros crescem de forma agressiva e metastática.¹⁻⁴ O auxílio de indicadores prognósticos complementares aos sistemas de classificação histopatológicos propostos por Patnaik, Ehler e Macewen² and Kiupel et al.⁵ podem tornar as avaliações mais precisas e reduzir as variabilidades intra e inter-observadores. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas fundamentais para a progressão das neoplasias, pois favorecem a degradação da matriz extracelular e, consequentemente, o processo de metastatização.^{6,7} Sendo assim, a caracterização da expressão das MMPs pode ser uma potencial ferramenta prognóstica para animais com MCTs. As MMPs 2 e 9, conhecidas como gelatinases, destacam-se pela sua capacidade de degradar colágeno tipo IV, um dos principais componentes da membrana basal.⁸ MMP-2 também é capaz de hidrolisar alguns colágenos, laminina e TGF- β . Já a MMP-9 é expressa por leucócitos polimorfonucleares (PMNL), macrófagos e endotélio, atuando sobre colágenos, proteoglicanos e elastina.⁹ A atividade das MMPs é regulada por enzimas denominadas Inibidores Teciduais de Metaloproteinases (TIMPs).¹⁰ TIMP-1 e TIMP-2 inibem a ação das gelatinases MMP-9 e 2 respectivamente.^{8,11}

O presente trabalho foi delineado para caracterizar a expressão imuno-histoquímica da MMP-2 e MMP-9, bem como os seus inibidores teciduais, TIMP-2 e TIMP-1, em mastocitomas cutâneos caninos, e verificar sua associação com os tipos histopatológicos, mortalidade relacionada à doença e sobrevida pós-cirúrgica.

Materiais e Métodos: Foram avaliados 53 mastocitomas removidos de 46 cães provenientes dos Hospitais Veterinários da FMVZ-USP, Universidade Metodista e da Clínica Veterinária Onco Cane.

Durante o acompanhamento foram registrados as variáveis: idade, sexo, raça, uso de quimioterapia, recidiva, sobrevida e *causa mortis*, quando aplicável. Foram analisados separadamente 12 cães que receberam quimioterapia adjuvante. Os mastocitomas foram classificados de acordo com os critérios de Patnaik, Ehler e Macewen² e Kiupel et al.⁵ Os tumores foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados rotineiramente. Os cortes foram incubados com anticorpos primários policlonais de coelho anti-MMP-2 (1:200) e anti-MMP-9 (1:300) e anticorpos monoclonais de camundongo anti-TIMP-2 (1:100) e anti-TIMP-1 (1:100), seguido pela aplicação de anticorpo secundário biotilado e, posteriormente, complexo estreptavidina-peroxidase, segundo indicação do fabricante (LSAB; Dako Cytomation). Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por IgG normal de mesma espécie e concentração. Os cortes foram avaliados quantitativamente pela percentagem média de mastócitos positivos em cinco campos de maior aumento (400x) selecionados a partir de áreas com o maior percentual de células marcadas ("hot spots"). Os resultados foram comparados pelo teste ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn. As associações foram avaliadas pelo teste Exato de Fisher. Dados de sobrevida foram analisados com o método de Kaplan Meier e teste log-rank. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi utilizado para comparar múltiplos marcadores. Teste de Spearman foi usado para avaliar a positividade dos PMNL. O nível de significância foi fixado em 5%. **Resultados e Discussão:** Os cães sem raça definida foram os mais representativos, seguidos por Boxers e Labradores Retrievers. Quando classificados pelos critérios de Patnaik et al. (1984) [2], cerca de 19% dos MCTs eram grau I, 49% grau II e 32% grau III. Utilizando o sistema de Kiupel et al. (2011)[5] 54,7% dos MCTs eram de baixo grau e 45,3% de alto grau. O acompanhamento variou de 3 a 2670 dias. Durante este período, 15 cães morreram devido ao MCT e 15 devido a outras causas. Assim como referido por diversos autores, a utilização de imunoistoquímica permitiu a demonstração dos padrões de distribuição e localização celular das MMP-2 e 9, e dos TIMPs 2 e 1 no MCT canino, bem como, a quantificação e a expressão das quatro proteínas estudadas nos mastócitos neoplásicos, nos fibroblastos, leucócitos polimorfonucleares e endotélio vascular intratumorais [12,13,14,15]. O uso desta técnica na busca de um índice prognóstico para os mastocitomas fornece uma maneira menos subjetiva para a determinação do curso da doença, sem que haja aumentos substanciais no tempo e custo [16]. A positividade de fibroblastos estromais e células endoteliais para as metaloproteinases é confirmada pelos dados presentes em literatura que demonstram fatores angiogênicos induzindo a expressão das MMPs no endotélio e no estroma celular [17,18]. Os níveis elevados de expressão de diversas MMPs, dentre elas as MMPs 2 e 9 e TIMPs (TIMP-1, 2 e 3), nos fibroblastos associados ao tumor geralmente estão relacionados a um maior risco de metástases distantes [19,20]. Não foi encontrada associação entre os sistemas de classificação histopatológicos e a imuno-positividade para qualquer uma das proteínas avaliadas.

Os resultados obtidos demonstram que a baixa expressão imuno-histoquímica de TIMP-1 (inferior a 22,9%) é um indicador de menor sobrevida pós-cirúrgica (P = 0,0136). O risco de morte devido ao MCT é 3,3 vezes maior nos casos com menos de 22,9% de mastócitos positivos para TIMP-1. Mesmo quando os animais submetidos à quimioterapia foram adicionados, a expressão de TIMP-1 ainda foi considerada um bom indicador de sobrevida (P = 0,0105).

Alterações no microambiente tumoral podem influenciar a progressão do câncer por meio de interações efetuadas entre MMPs e TIMPs fazem com que as células superem os obstáculos fisiológicos [21, 22, 23,24]. Têm sido constatado que os TIMPs impedem a disseminação do tumor por inibição das MMPs, pela supressão da angiogênese e por desencadear a apoptose de células malignas