

[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 biotinilado 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

[25,26]. Experimentos in vitro demonstraram que a superexpressão de TIMP-1 tem propriedades antineoplásicas, por exemplo, em hepatocarcinoma [27] e melanomas [28]. Além disso a utilização de modelos in vivo demonstrou que níveis elevados de TIMP-1 exógeno inibem crescimento celular e angiogênese em tumores de aloenxerto de murino [29]. Aresu et al. (2011) [12] avaliaram a expressão gênica de TIMP-1 em tumores de mama de cadelas e também encontraram que a alta expressão de TIMP-1 teve um discreto efeito protetivo. Adicionalmente, as expressões imunohistoquímicas nos mastócitos e leucócitos polimorfonucleares apresentaram correlação positiva para todos os marcadores testados (MMP-2, P=0,0435; MMP-9, P=0,0003; TIMP-2, P=0,0281; TIMP-1, P<0,0001). É provável que essas células possam colaborar na remodelação do estroma, mas estudos futuros são necessários para a confirmação desta hipótese e elucidação da razão para essa correlação, bem como, para determinar se os mastócitos neoplásicos podem estimular ou aumentar a produção estromal de MMPs e TIMPs, contribuindo para a progressão do tumor.

Foi constatado que as expressões de MMP-2, MMP-9 e TIMP-2 não são bons indicadores prognósticos para sobrevida e mortalidade relacionada à doença. Finalmente, os resultados obtidos sugerem o envolvimento de TIMP-1 na progressão do MCT, corroborando a idéia de um "efeito protetor" desta proteína [29,30,31]. **Conclusão:** O TIMP-1 apresenta expressão significativamente mais elevada em animais com maior sobrevida, o que sugere um papel desta molécula em prevenir a progressão tumoral. No entanto, não foi observada qualquer associação entre o TIMP-1 e graus histopatológicos. A avaliação desta proteína pode representar um fator prognóstico independente para os mastocitomas caninos. É provável que o TIMP-1 possa inibir diretamente a MMP-9 e/ou outras enzimas, assim como antagonizar a angiogênese e/ou iniciar a apoptose de células malignas, o que conduz a um bom resultado nos pacientes com mastocitoma cutâneo. Futuros estudos são necessários para a elucidação de tais questões e, eventualmente, encontrar novos alvos terapêuticos para esta importante neoplasia canina. **Apoio financeiro:** Este estudo teve auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2010/05094-5 e 2013/13252-8).

Referências

- [1] BOSTOCK, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J. Small Anim. Pract.*, Oxford, v. 14, n. 1, p. 27-41, Jan. 1973.
- [2] PATNAIK, A. K.; EHLER, W. J.; MACEWEN, E. G. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 21, n. 5, p. 469-474, Sept. 1984.
- [3] SIMÕES, J. P.; SCHONING, P.; BUTINE M. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.*, Basel, v. 31, n. 6, p. 637-647, Nov. 1994.
- [4] STREFEZZI, R. F. et al. Nuclear morphometry in cytopathology: a prognostic indicator for canine cutaneous mast cell tumors. *J. Vet. Diagn. Invest.*, Columbia, v. 21, n. 6, p. 821-825, Nov. 2009.
- [5] KIUPEL, M. et al. Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet. Pathol.*, Thousand Oaks, v. 48, n. 1, p. 147-155, Jan. 2011.
- [6] CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *J. Pathol.*, London, v. 189, n. 3, p. 300-308, Nov. 1999.
- [7] ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. *Essays Biochem.*, London, v. 38, p. 21-36, 2002.
- [8] PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodeling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, London, v. 8, n. 3, p. 221-233, Mar. 2007.
- [9] DOCHERTY, A. J. et al. The matrix metalloproteinases and their natural inhibitors: prospects for treating degenerative tissue disease. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, v. 10, n. 6, p. 200-207, June 1992.
- [10] VISSÉ, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.*, Baltimore, v. 92, n. 8, p. 827-839, May 2003.
- [11] BREW, K.; DINAKARPANDIAN, D.; NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1477, n. 1-2, p. 267-283, Mar. 2000.
- [12] ARESU, A. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in canine mammary tumors. *BMC Vet. Res.*, London, v. 7, p. 33-43, July 2011.
- [13] GIANTIN, M. et al. Expression of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and vascular endothelial growth factor in canine mast cell tumours. *J. Comp. Pathol.*, Liverpool, v. 147, n. 4, p. 419-429, Nov. 2012.
- [14] NAKAICHI, M. et al. Activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in canine oronasal tumors. *Res. Vet. Sci.*, Oxford, v. 82, n. 2, p. 271-279, Apr. 2007.
- [15] PAPPARELLA, S. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and the activator membrane type 1 (MT1-MMP) in canine mammary carcinomas. *J. Comp. Pathol.*, Liverpool, v. 126, n. 4, p. 271-276, May 2002.
- [16] FIELDING, L. P.; HENSON, D. E. Multiple prognostic factors and outcome analysis in patients with cancer. *Cancer*, New York, v. 71, n. 7, p. 2426-2429, Apr. 1993.
- [17] RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J. Cell Mol. Med.*, Oxford, v. 9, n. 2, p. 267-285, Apr.-June 2005.
- [18] SHAMAMIAN, P. et al. Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: A role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J. Cell. Physiol.*, New York, v. 189, n. 2, p. 197-206, Nov. 2001.
- [19] DEL CASAR, J. M. et al. Comparative analysis and clinical value of the expression of metalloproteinases and their inhibitors by intratumor stromal fibroblasts and those at the invasive front of breast carcinomas. *Breast Cancer Res. Treat.*, The Hague, Boston, v. 116, n. 1, p. 39-52, July 2009.
- [20] VIZOSO, F. J. et al. Study of matrix metalloproteinases and their inhibitors in breast cancer. *Br. J. Cancer*, London, v. 96, n. 6, p. 903-11, Mar. 2007.
- [21] BERGAMASCHI, A. et al. Extracellular matrix signature identifies breast cancer subgroups with different clinical outcome. *J. Pathol.*, London, v. 214, n. 3, p. 357-367, Feb. 2008.
- [22] ZHANG, B. et al. Tumor-derived matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) correlates with poor prognoses of invasive breast cancer. *BMC Cancer*, London, v. 8, p. 83, Mar. 2008.
- [23] ROWE, R. G.; WEISS, S. J. Navigating ECM barriers at the invasive front: the cancer cell-stroma interface. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, Palo Alto, CA, v. 25, p. 567-595, 2009.
- [24] KESSENBRÖCK, K.; PLAKS, V.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*, Cambridge, v. 141, n. 1, p. 52-67, Apr. 2010.
- [25] TSUCHIYA, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is a negative regulator of the metastatic ability of a human gastric cancer cell line, KKLS, in the chick embryo. *Cancer Res.*, Chicago, v. 53, n. 6, p.1397-1402, Mar. 1993.
- [26] HILSKA, M. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, New York, v. 121, n. 4, p. 714-723, Aug. 2007.
- [27] MARTIN, D. C. et al. Inhibition of SV40 T antigen-induced hepatocellular carcinoma in TIMP-1 transgenic mice. *Oncogene*, Basingstoke, v. 13, n. 3, p. 569-76, Aug. 1996.
- [28] KHOKHA, R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells in vivo by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, MD, v. 86, n. 4, p. 299-304, Feb. 1994.
- [29] IKENAKA, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) inhibits tumor growth and angiogenesis in the TIMP-1 transgenic mouse model. *Int. J. Cancer*, New York, v. 105, n. 3, p. 340-346, June 2003.
- [30] KHOKHA, R. et al. Suppression of invasion by inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in B16-F10 melanoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, MD, v. 84, n. 13, p.1017-1022, July 1992.
- [31] HILSKA, M. et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1,-2,-7 and-13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1,-2,-3 and-4 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, New York, v. 121, n. 4, p. 714-723, Aug. 2007.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA RAIVA ISOLADOS DE CANÍDEOS PROCEDENTES DA REGIÃO NORTE E NORDESTE DO BRASIL

SOUZA, DÉBORA NUNES DE¹; OLIVEIRA, RAFAEL DE NOVAES²; MACEDO, CARLA ISABEL²; RUTHNER, HELENA BEATRIZ DE CARVALHO²; PEREIRA, PATRÍCIA MARIANO DA CRUZ²; FERNANDES, MARCÉLIA EMANUELE SAD³; SOUZA, TATIANE DE CÁSSIA PARDO DE²; CARNIELI JÚNIOR, PEDRO²; CASTILHO, JULIANA GALERA²

1. Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD), São Paulo, SP, Brasil
2. Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil
3. Universidade Federal do ABC, Santo André, SP, Brasil

Introdução e Objetivos: A raiva ainda é um grave problema de saúde pública e mesmo com o aumento da eficiência das vacinas e medidas profiláticas estima-se que aproximadamente 70 mil pessoas morram