

## XXIII SEMANA DO VPT

Confira os resumos da XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli do Departamento de Patologia da FMVZ-USP

## ENSINO

Trabalho apresenta modelos didáticos para compreensão do desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos

## CLÍNICA DE PEQUENOS ANIMAIS

Artigo apresenta estudo sobre o tratamento de cães com doença de disco intervertebral cervical por meio de técnicas da Fisioterapia Veterinária, especialidade que tem despertado grande interesse nos médicos veterinários devido à sua aplicação não invasiva





EX LIBRIS



CRMV-SP

**Editorial**

**5** Corpo de revisores

**Clínica de Pequenos Animais**

**6** Associação do sulfato de vincristina no manejo terapêutico da trombocitopenia imunomediada canina: relato de caso

**10** Tratamento de doença de disco intervertebral em cão com fisioterapia e reabilitação veterinária: relato de caso

**Clínica de Grandes Animais**

**18** Fístula abomaso-umbilical em bezerro: relato de caso

**Ensino**

**24** Modelos didáticos para compreensão do desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos

**Reprodução Animal**

**30** Reconhecimento materno da gestação em animais de produção

**Resumos**

**36** XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli

**99** Normas para publicação

Foto: photodune.com



Uma publicação



**CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO ESTADO DE SÃO PAULO – CRMV-SP**

**DIRETORIA EXECUTIVA**

- Presidente** Méd. Vet. Francisco Cavalcanti de Almeida
- Vice-presidente** Méd. Vet. Mário Eduardo Pulga
- Secretário-geral** Méd. Vet. Sílvio Arruda Vasconcellos
- Tesoureira** Méd. Vet. Eliana Kobayashi
- Conselheiros Efetivos** Méd. Vet. Carlos Maurício Leal  
Méd. Vet. Márcio Rangel de Mello  
Méd. Vet. Otávio Diniz  
Méd. Vet. Antônio Guilherme Machado de Castro  
Méd. Vet. José Rafael Modolo  
Méd. Vet. Yves Miceli de Carvalho
- Conselheiros Suplentes** Méd. Vet. Abrahão Buchatsky  
Méd. Vet. Alexandre Jacques Louis Develey  
Méd. Vet. Fábio Fernando Ribeiro Manhoso  
Méd. Vet. José Antônio Visintin  
Méd. Vet. Mitika Kuribayashi Hagiwara

**URFAS**

- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Araçatuba** Rua Oscar Rodrigues Alves, 55, 7º andar, sl. 12  
Fone: (18) 3622 6156 | Fax: (18) 3622 8520  
dr.aracatuba@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Botucatu** Rua Amando de Barros, 1040  
Fone/fax: (14) 3815 6839  
dr.botucatu@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Campinas** Av. Dr. Campos Sales, 532, sl. 23  
Fone: (19) 3236 2447 | Fax: (19) 3236 2447  
dr.campinas@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Marília** Av. Rio Branco, 936, 7º andar  
Fone/fax: (14) 3422 5011  
dr.marilia@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Presidente Prudente** Av. Cel. José Soares Marcondes, 983, sl. 61  
Fone: (18) 3221 4303 | Fax: (18) 3223 4218  
dr.prudente@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Ribeirão Preto** Rua Visconde de Inhaúma, 490, cj. 306 a 308  
Fone/fax: (16) 3636 8771  
dr.ribeirao@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Santos** Av. Almirante Cochrane, 194, cj. 52  
Fone/fax: (13) 3227 6395  
dr.santos@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – São José do Rio Preto** Rua Marechal Deodoro, 3.011, 8º andar  
Fone/fax: (17) 3235 1045  
dr.riopreto@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Sorocaba** Rua Sete de Setembro, 287, 16º andar, cj.165  
Fone/fax: (15) 3224 2197  
dr.sorocaba@crmvsp.gov.br
- Unidade Regional de Fiscalização e Atendimento – Taubaté** Rua Jacques Felix, 615  
Fone: (12) 3632 2188 | Fax: (12) 3622 7560  
dr.taubate@crmvsp.gov.br

**REVISTA DE EDUCAÇÃO CONTINUADA EM MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

Reconhecida como veículo de divulgação técnico-científica pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), Resolução nº 689, de 25 de julho de 2001.

**INDEXAÇÃO**

A Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia está indexada na Base de Dados da Biblioteca Nacional de Agricultura (BINAGRI) e na Biblioteca Virtual em Medicina Veterinária e Zootecnia (BVS-Vet).

**CONSELHO EDITORIAL**

- Editor científico** Méd. Vet. Sílvio Arruda Vasconcellos
- Editores associados** Méd. Vet. Alexandre Jacques Louis Develey  
Méd. Vet. José Cezar Panetta  
Méd. Vet. Eduardo Harry Birgel  
(Academia Paulista de Medicina Veterinária – Apamvet)

**COMISSÃO EDITORIAL**

- Presidente** Méd. Vet. Sílvio Arruda Vasconcellos  
Méd. Vet. José Rafael Modolo  
Méd. Vet. Mário Eduardo Pulga  
Méd. Vet. Alexandre Jacques Louis Develey

**CORPO EDITORIAL AD HOC**

- Méd. Vet. Alice Maria Paula Della Libera
- Méd. Vet. Bruno Machado Bertassoli
- Méd. Vet. Carlos Eduardo Malavasi Bruno
- Méd. Vet. Cláudio Ronaldo Pedro
- Méd. Vet. Gilson Hélio Toniollo
- Méd. Vet. Maria Cláudia Araripe Supcipira
- Méd. Vet. Milton Kolber

**Assessoria de Comunicação**

- Editor Responsável** Méd. Vet. Sílvio Arruda Vasconcellos
- Jornalista Responsável** Laís Domingues - MTB: 59.079/SP  
revista@crmvsp.gov.br

**Sede do CRMV-SP**

- Rua Apeninos, 1088, Paraíso – São Paulo (SP)
- Fone: (11) 5908 4799
- Fax: (11) 5084 4907
- www.crmvsp.gov.br

**Revisão Técnica**

- Projeto Gráfico** Academia Paulista de Medicina Veterinária – Apamvet
- Diagramação** Plínio Fernandes – Traço Leal
- Impressão** TL Publicidade e Assessoria Ltda.
- Periodicidade** Rettec Artes Gráficas e Editora Ltda.
- Tiragem** 27.000 exemplares
- Site** quadrimestral

**Distribuição gratuita**

as edições da Revista MV&Z estão disponíveis no site <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz>.

Prezado colega,



Fale conosco

revista@crmvsp.gov.br

**I**niciamos 2015 com mais uma edição da Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia e, com ela, a atual Diretoria Executiva se despede do colega após nove anos a frente do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo (CRMV-SP).

Durante todo o período em que dirigimos o CRMV-SP, um dos principais objetivos foi o estímulo à atualização técnica profissional de médicos veterinários e zootecnistas. Tendo em vista o desejo de colaborar com esta jornada, retomamos, em 2011, as publicações da Revista MV&Z, que haviam sido interrompidas em 2005, e reformulamos a publicação. Com esta edição, já são 12 fascículos em cujas páginas foram apresentados 54 artigos, além de resumos de trabalhos ou de palestras apresentadas em 15 eventos científicos.

Reiteramos que a Revista MV&Z é uma importante fonte de informação e conhecimento para os profissionais e a sua elaboração depende, fundamentalmente, da sua participação. Por isso, agradecemos a todos os colegas que, de alguma forma, contribuíram, sejam como autores ou revisores dos trabalhos publicados, durante esses anos.

Agradecemos por termos tido a oportunidade de apoiá-los em seu crescimento profissional e fazemos votos de que a nova diretoria permaneça perseverante na empreitada em auxiliá-los nesta jornada constante em busca do aprimoramento técnico e da conquista de novas metas e ideais profissionais. Agradecemos, também, aos profissionais que fazem parte da equipe do CRMV-SP, sem os quais nada do que fizemos teria sido possível.

Nessa edição, teremos como destaques: na seção de Clínica de Pequenos Animais, um artigo sobre o tratamento de doença de disco intervertebral em cão por meio de técnicas da Fisioterapia Veterinária, área que tem despertado interesse. Na mesma seção, teremos, ainda, um trabalho sobre a associação do sulfato de vincristina no manejo terapêutico da trombocitopenia imunomediada canina.

Na seção de Clínica de Grandes Animais, será apresentado um trabalho sobre fistula abomaso-umbilical em bezerro; na área Ensino, modelos didáticos para compreensão do desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos; e na de Reprodução Animal, um estudo sobre o reconhecimento materno da gestação em animais de produção. Esta edição ainda traz resumos dos trabalhos apresentados durante a XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli, realizada pelo Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Desejamos uma ótima leitura.

## ○ Conselho é de todos!

Francisco Cavalcanti de Almeida, Presidente do CRMV-SP

### CORPO DE REVISORES

Adriana Maria Lopes Vieira, CRMV-SP  
 Agar Costa Alexandrino de Perez, CRMV-SP  
 Alexandre Jacques Louis Develley, Apamvet/ CRMV-SP  
 Alexander Welker Biondo, UFPR  
 Alice Maria Paula Della Libera, FMVZ USP  
 Ana Cristina Nery de Castro, Méd. Vet. Autônoma  
 Ana Paula de Araújo, CRMV-SP  
 Angelo João Stopiglia, FMVZ-USP / Apamvet  
 Antonio Carlos Paes, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Antônio Guilherme Machado de Castro, CRMV-SP  
 Antonio J. Piantino Ferreira, FMVZ-USP  
 Arani Nanci Bomfim Mariana, Apamvet  
 Archivaldo Reche Junior, FMVZ-USP  
 Arsênio Baptista, Med. Vet. Autônomo  
 Benedicto Wladimir de Martin, Apamvet  
 Bruno Machado Bertassoli, UFMG  
 Carla Bargi Belli, FMVZ-USP  
 Carlos Alberto Hussni, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Carlos Eduardo Larsson, CRMV-SP  
 Carlos Eduardo Malavasi Bruno, FMVZ-USP  
 Célia Regina Orlandelli Carrer, CRMV-SP  
 Ceres Berger Faraco, Amvebbea  
 Cintia Aparecida Lopes Godoy-Esteves, Hospital Veterinário Santa Inês  
 Cláudia Barbosa Fernandes, FMVZ-USP  
 Cláudia Rodrigues Emilio de Carvalho, Med. Vet. Autônoma  
 Cláudio Ronaldo Pedro, CRMV-SP  
 Daniel G. Ferro, FMVZ-USP  
 Édson Ramos de Siqueira, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Eduardo Harry Birgel, Apamvet  
 Eduardo Harry Birgel Junior, FZEA – USP Pirassununga  
 Eliana Kobayashi, CRMV-SP

Eliana Roxo, Instituto Biológico  
 Éverton Kort Kamp Fernandes, UFG  
 Fábio Fernando Ribeiro Manhoso, UNIMAR – SP  
 Fernando José Benesi, FMVZ-USP  
 Flávio Massone, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Fumio Honma Ito, FMVZ-USP  
 Gilson Hélio Toniolo, FCAV-Unesp Jaboticabal  
 Helenice de Souza Spinosa, FMVZ-USP  
 Henrique Luis Tavares, CRMV-SP  
 João Palermo Neto, FMVZ-USP  
 John Furlong, Embrapa  
 José Antônio Visintin, FMVZ-USP  
 José de Angelis Côrtes, Apamvet  
 José Henrique Ferreira Musumeci, Med. Vet. Autônomo  
 José Rafael Modolo, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Josete Garcia Bersano, Instituto Biológico  
 Júlia Maria Matera, FMVZ-USP  
 Karime Cury Scarpelli, CRMV-SP  
 Leonardo Brandão, CEVA Saúde Animal  
 Luis Cláudio Lopes Correa da Silva, FMVZ-USP  
 Luiz Carlos Vulcano, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, FMVZ-USP  
 Marcelo Bahia Labruna, FMVZ-USP  
 Marcelo da Silva Gomes, CRMV-SP  
 Marcelo Monte Mór Rangel, Vet Câncer  
 Márcio Corrêa, UFPEL  
 Márcio Garcia Ribeiro, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Márcio Rangel de Mello, CRMV-SP  
 Marco Antônio Leon-Roman, FMVZ-USP  
 Marcos Veiga dos Santos, FMVZ-USP  
 Maria Angélica Miglino, FMVZ-USP

Maria Cláudia Araripe Sucupira, FMVZ-USP  
 Maria de Lourdes A. Bonadia Reichmann, CRMV-SP  
 Mario Eduardo Pulga, CRMV-SP  
 Maristela Pituco, Instituto Biológico  
 Milton Kolber Unip Unimes Unisa, UNIP/Unimes/Unisa  
 Mitika Kuribayashi Hagiwara, Apamvet/ CRMV-SP  
 Nádia Maria Bueno Fernandes Dias, CRMV-SP  
 Nilson Robert Benites, CRMV-SP  
 Odemilson Mossero, MAPA  
 Paulo Francisco Domingues, FMVZ Unesp Botucatu  
 Paulo Marcelo Tavares Ribeiro, CRMV-SP  
 Paulo Sérgio de Moraes Barros, FMVZ-USP  
 Raimundo de Souza Lopes, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Ricardo Moreira Calil, CRMV-SP  
 Rita de Cássia Maria Garcia, CRMV-SP  
 Roberto Calderon Gonçalves, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Roberto de Oliveira Roça, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Sarita Bonagurio Gallo, FZEA – USP Pirassununga  
 Sílvia Ferrari, Universidade Anhembi Morumbi  
 Silvio Arruda Vasconcellos, CRMV-SP  
 Silvio Marcy dos Santos, Instituto Biológico  
 Solange Maria Gemari, FMVZ-USP  
 Sonia Regina Pinheiro, FMVZ-USP  
 Sony Dimas Bicudo, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Stélio Pacca Loureiro Luna, FMVZ-Unesp Botucatu  
 Terezinha Knöbl, FMVZ-USP  
 Vicente Borelli, Apamvet  
 Waldir Gandolfi, Apamvet  
 Wilson Roberto Fernandes, FMVZ-USP

# Associação do sulfato de vincristina no manejo terapêutico da trombocitopenia imunomediada canina: relato de caso

## Association of vincristine sulfate on therapeutic management of canine immune-mediated thrombocytopenia: a case report

### Resumo

A trombocitopenia imunomediada, destruição plaquetária mediada pelas respostas humoral e celular, é observada com frequência na espécie canina, especialmente nas fêmeas de meia-idade das raças spaniel e Doberman. A primeira linha terapêutica envolve a administração de corticoides em doses imunossupressoras e, nos casos refratários, a associação farmacológica a outros agentes imunomoduladores faz-se necessária. A presente descrição de caso objetiva relatar o sucesso na associação do sulfato de vincristina à corticoideterapia (Dexametasona), durante o período de hospitalização de cão com trombocitopenia imunomediada primária e sangramentos espontâneos relacionados, bem como discutir as modalidades terapêuticas presentes na literatura.

### Summary

Immune-mediated thrombocytopenia, platelet destruction mediated by humoral and cellular responses, is frequently observed in dogs, especially in middle-age females of spaniels and Doberman breeds. The first line therapy involves the administration of corticosteroids in immunosuppressive doses and, in refractory cases, the pharmacological combination with other immunomodulatory agents seems often necessary. This case report describes the successful combination of vincristine sulfate to glucocorticoids (Dexamethasone) during the hospitalization of a dog with primary immune-mediated thrombocytopenia and related spontaneous bleeding, and discusses the therapeutic modalities in the literature.

Recebido em 25 de agosto de 2014 e aprovado em 7 de setembro de 2014

Fabio Navarro Baltazar<sup>1</sup>

Alex Lafarti de Sena<sup>2</sup>

Cecília F. B. Augusto<sup>2</sup>

Andréa Chemin<sup>2</sup>

Carla Alice Bearl<sup>3</sup>

Marcelo Quinzani<sup>3</sup>



#### Palavras-chave

Trombocitopenia.  
Autoimunidade. Cães.

#### Keywords

Thrombocytopenia.  
Autoimmunity. Dogs.

O termo trombocitopenia se refere à diminuição na contagem plaquetária para valores abaixo dos limites de normalidade, e sua gênese está alicerçada sobre três situações patológicas distintas, caracterizadas por queda na produção de plaquetas pela medula óssea, destruição periférica e sequestro esplênico, respectivamente (IZAK; BUSSEL, 2014). A primeira das situações clínicas citadas pode ser exemplificada nas síndromes que levam à falência medular como anemias aplásticas e síndromes mielodisplásicas, ou processos neoplásicos, como nos linfomas, leucemias, mieloma múltiplo e metástases diversas (ASTER, 1966). Os processos destrutivos periféricos podem ser observados na coagulação intravascular disseminada e destruições mediadas imunologicamente, e o sequestro plaquetário, por sua vez, ocorre principalmente nas esplenopatias, com especial destaque para os casos de envolvimento neoplásico (ASTER, 1966). Sendo assim, define-se trombocitopenia imunomediada como a condição clínica na qual se observa destruição plaquetária por macrófagos, após fagocitose mediada pela imunidade humoral, por meio da produção de anticorpos contra os antígenos de membrana da superfície de plaquetas (SCOTT, 2005). Nesse contexto, os anticorpos IgG são os mais frequentes e podem ter ação inclusive sobre os megacariócitos, além das plaquetas circulantes (BOMMER et al., 2008).

Em seres humanos, a doença é caracterizada como púrpura trombocitopênica idiopática, frequente em crianças, e definida pela

1 Médico Veterinário – Clínica Médica de Pequenos Animais – Hospital Veterinário Pet Care

2 Médico Veterinário – Unidade de Terapia Intensiva – Hospital Veterinário Pet Care

3 Médico Veterinário – Diretoria Clínica – Hospital Veterinário Pet Care

ocorrência de trombocitopenia isolada com curso clínico agudo ou crônico, quando persiste além de 1 ano, sendo esta forma prevalente em adultos, onde 5,6 a 20 para cada 100 mil indivíduos são acometidos, predominando em mulheres (KRETLI et al., 2011). Nos cães, a doença é conhecida por trombocitopenia imunomediada idiopática, de ocorrência primária ou secundária, e observada com maior frequência em adultos jovens, fêmeas, das raças spaniel e Dobermann (COOK et al, 1994). Os sinais clínicos envolvidos na maioria dos casos, e comuns a ambas as espécies, são petéquias, sufusões, equimoses, gengivorragias, hemorragia digestiva, hematúria, sangramentos intracranianos e outras diáteses hemorrágicas graves e potencialmente fatais, relatadas em 5% dos seres humanos acometidos (KRETLI et al., 2011; LITTLEWOOD, 2001).

As bases terapêuticas no controle da doença em ambas as espécies são bastante semelhantes, apesar da farmacoterapia ser iniciada em seres humanos apenas quando a contagem plaquetária mostra-se inferior a 20 mil/mm<sup>3</sup> ou quando sangramentos espontâneos estão presentes, uma vez que pacientes com trombocitopenia leve a moderada (entre 30 mil e 50 mil/mm<sup>3</sup>) e assintomáticos tendem a curso clínico insidioso e autolimitante (KRETLI et al., 2011). Os corticosteroides são os fármacos de primeira escolha, e a maior parte dos cães afetados pela doença irão apresentar contagem de plaquetas superior a 50 mil/mm<sup>3</sup> após 7 dias de tratamento em dose imunossupressora (LEWIS; MEYERS, 1996). Outros fármacos imunossupressores podem ser associados nos casos refratários à terapêutica inicial, dos quais apenas a Vincristina (VINC) e a Imunoglobulina Intravenosa Humana (hIVIG) são citados como efetivos em estudos retrospectivos (WHITLEY; DAY, 2011).

A Vincristina, extraída da planta *Vinca rosea* Linn, é um fármaco amplamente utilizado na oncologia médico-veterinária. Porém, em doses menores (0,02 mg/kg), pode ser empregada como fármaco adjuvante na trombocitopenia imunomediada. Sua propriedade quimioterápica está alicerçada na afinidade pela proteína tubulina, bloqueando sua polimerização e gerando destruição dos microtúbulos, o que impedirá a formação do fuso mitótico e a subsequente divisão celular (FARO et al., 2008). No contexto destrutivo imunomediado, a estimulação da linhagem megacariocítica medular e bloqueio da fagocitose de plaquetas opsonizadas por macrófagos justificam seu emprego terapêutico (LEWIS; MEYERS, 1996).

Balog e colaboradores (2013), em estudo clínico randomizado prospectivo, envolvendo o emprego de VINC e hIVIG em pacientes com a doença plaquetária em questão, constataram que o tempo de recuperação dos indivíduos inseridos em ambos os grupos foi menor do que aqueles tratados apenas com glicocorticoide e destes, o grupo no qual a vincristina foi utilizada apresentou o menor tempo de recuperação (6 dias). Logo, o presente relato tem por objetivo descrever o sucesso no manejo terapêutico da

trombocitopenia imunomediada em cão com o emprego da associação de Sulfato de Vincristina à corticoideterapia.

### Descrição do Caso

Um cão da raça poodle, com seis anos de idade, foi admitido no ambulatório do Hospital Veterinário Pet Care, com histórico de petéquias e equimose em flanco havia cinco dias do atendimento, e nos dois dias anteriores passara a apresentar gengivorragia espontânea, apesar de manutenção na disposição e apetite, e ausência de sangramentos gastrointestinal e urinário. Ainda no que se refere ao histórico, o animal havia sido vacinado dois dias antes do surgimento das alterações cutâneas acima descritas, por colega, que tomou conhecimento dos sinais clínicos subsequentes e solicitou avaliação hematológica completa, na qual se observou 12 mil/mm<sup>3</sup> plaquetas (sem outras alterações relevantes), e iniciou terapia com Doxiciclina (5 mg/Kg/ BID P.O.) e Prednisona (2 mg/Kg BID). Após 72 horas da terapia em questão, o animal foi submetido a reavaliação hematológica pelo colega, a qual demonstrou 10 mil/mm<sup>3</sup> plaquetas e 22 mil/mm<sup>3</sup> leucócitos (sem outras alterações), momento esse no qual passou a apresentar sangramento oral espontâneo e foi encaminhado a este estabelecimento. No exame físico, foram observadas mucosas normocoradas, hidratação boa, inúmeras petéquias distribuídas pelo tronco e região ventral de abdome, além de grande equimose em flanco esquerdo (área onde foi vacinada) e gengivorragia. O animal encontrava-se ainda normotérmico (39,0°C) e sem alterações na palpação abdominal e auscultação cardiopulmonar. Previamente à admissão terapêutica intensiva, foram solicitados novo hemograma e avaliação bioquímica completa, além de sorologia (Elisa) para *Dirofilaria Immits*, *Erlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, urina tipo I e exame ultrassonográfico abdominal, nos quais se destacaram, respectivamente, anemia normocítica normocrômica (hematócrito 19,4%), índice de reticulócitos de 0,81 (padrão não regenerativo), 33,28 mil/mm<sup>3</sup> leucócitos com desvio à esquerda (1.664 bastonetes), 11 mil/mm<sup>3</sup> plaquetas, e negatividade para os agentes infecciosos pesquisados (os demais resultados mostraram-se sem valor diagnóstico). Logo, durante o tratamento intensivo, a antibioticoterapia iniciada pela colega foi mantida e a corticoideterapia introduzida por meio de Dexametasona na dose de 0,5 mg/kg/sid intravenosa, além de Cloridrato de Ranitidina, Sucralfato e Ácido Tranexâmico como terapia suporte, em doses e frequência usuais. Nos três primeiros dias de internação, a contagem de plaquetas se manteve baixa (11 mil/mm<sup>3</sup>, 8 mil/mm<sup>3</sup> e 10 mil/mm<sup>3</sup> respectivamente), concomitantemente à manutenção de leucocitose (33 mil/mm<sup>3</sup>, 30,56 mil/mm<sup>3</sup> e 30,98 mil/mm<sup>3</sup>) e queda progressiva no hematócrito (19,4%, 9,3% e 8%), momento no qual foi procedida transfusão de 360 ml de sangue total, elevando o hematócrito a 32% (a contagem plaquetária pós-transfusional revelou-se em 10 mil/mm<sup>3</sup>). A decisão de imunossupressão

quimioterápica foi tomada no dia subsequente, quando se optou pela associação de Sulfato de Vincristina, na dose de 0,02 mg/kg intravenosa, em aplicação única, ao protocolo terapêutico vigente até o momento. As avaliações hematológicas sequenciais demonstraram importante resposta na contagem plaquetária nos dois dias seguintes de terapia intensiva (264 mil/mm<sup>3</sup> e 256 mil/mm<sup>3</sup>), com manutenção do hematócrito (26%) e resolução da leucocitose (21 mil/mm<sup>3</sup> e 15,6 mil/mm<sup>3</sup> respectivamente). Logo, o animal foi liberado com prescrições do mesmo suporte gastrointestinal e antibioticoterapia iniciados no período de internação, além de Prednisolona (2 mg/kg/bid) por tempo indeterminado (na dependência dos próximos resultados laboratoriais).

### Discussão

A utilização do sulfato de vincristina em cães com trombocitopenia imunomediada foi descrita pela primeira vez em 1982 (GREENE et al., 1982). Outros agentes imunossuppressores, como ciclofosfamida, azatioprina, e danazol não possuem sua eficácia determinada por estudos controlados para essa afecção; apenas por relatos individuais ou ensaios limitados a poucos pacientes. Fármacos como Leflunomide e Ciclosporina apresentaram efeitos positivos na recuperação hematológica, porém, após alguns dias do início da terapia, foram constatados efeitos colaterais limitantes (BIANCO; HARDY, 2009). No presente caso clínico, a suspeita de destruição plaquetária imunomediada surgiu a partir da negatividade do resultado sorológico para alguns dos principais agentes infecciosos incriminados na trombocitopenia canina (apesar da possibilidade de ausência de soroconversão até o momento da investigação laboratorial), ausência de perdas (como causa da plaquetopenia) e de resposta terapêutica à Doxiciclina, mesmo após cinco dias de administração. A transfusão de concentrado de plaquetas não foi procedida devido a sua contra-indicação nas suspeitas de processos imunomediados, uma vez que pode aumentar o estímulo à destruição plaquetária, como já descrito previamente (ABRAMS-OGG et al., 1993). Além disso, a decisão de adição do sulfato de vincristina ao protocolo medicamentoso deu-se pela ausência de resposta terapêutica aos corticosteroides após cinco dias de administração, e persistência da gengivorragia durante esse período, sinais estes que poderiam ter sido associados a outras diáteses hemorrágicas, com consequente diminuição da sobrevida. Desse modo, a rápida recuperação da contagem de plaquetas, observada 24 horas após aplicação de Vincristina, reforça sua eficácia no presente caso clínico.

### Conclusão

A trombocitopenia imunomediada em cães, na dependência de seu curso clínico, pode trazer severas consequências ao paciente, especialmente nos casos de importante queda na contagem plaquetária, como sangramentos em sistema nervoso central e diminuição da sobrevida. Desse modo, o sucesso na associação terapêutica utilizada para o caso

clínico em questão oferece ao clínico de pequenos animais a possibilidade do emprego do Sulfato de Vincristina, na dose descrita neste trabalho, como segunda linha de tratamento para os pacientes com destruição plaquetária imunomediada, refratários à corticoideterapia inicial, com as vantagens de baixo custo terapêutico, fácil administração e diminuição do tempo total de hospitalização. ✎

## Referências

- ABRAMS-OGG, A. C. G.; KRUTH, S. A.; CARTER, R. F.; VALLI, V. E.; KAMEL-REID, S.; DUBE, I. D. Preparation and transfusion of canine platelet concentrates. *American Journal of Veterinary Research*, v. 54, p. 635-642, 1993.
- ASTER, R. H. Pooling of platelets in the spleen: role in the pathogenesis of "hypersplenic" thrombocytopenia. *Journal of Clinical Investigation*, v. 45, p. 645-657, 1966.
- BALOG, K.; HUANG, A. A.; SUM, S. O.; MOORE, G. E.; THOMPSON, C.; SCOTT-MONCRIEF, J. C. A Prospective Randomized Clinical Trial of Vincristine versus Human Intravenous Immunoglobulin for Acute Adjunctive Management of Presumptive Primary Immune-Mediated Thrombocytopenia in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, p. 536-541, 2013.
- BIANCO, D.; HARDY, R. M.; Treatment of Evans' syndrome with human intravenous immunoglobulin and leflunomide in a diabetic dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 45, p. 147-150, 2009.
- BOMMER, N. X.; SHAW, D. J.; MILNE, E. M.; RIDYARD, A. E. Platelet distribution width and mean platelet volume in the interpretation of thrombocytopenia in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 48, p. 518-524, 2008.
- COOK, A. K.; BERTOY, E. H.; GREGORY, C. R.; STEWART, A. F. Effect of oral cyclosporine in dogs with refractory immune-mediated anaemia or thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 08, p. 170, 1994.
- FARO, A. M.; DALECK, C. R.; SANTANA, A. E.; NARDI, A. B.; MOTTA, F. R.; EURIDES, D. Avaliação hematológica em cães submetidos ao tratamento quimioterápico com sulfato de vincristina, prednisona e ciclofosfamida: estudo experimental. *ARS Veterinária*, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2008.
- GREENE, C. E.; SCOGGIN, J.; THOMAS, J. E.; BARSANTI, J. A. Vincristine in the treatment of thrombocytopenia in five dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 180, p. 140-143, 1982.
- IZAK, M.; BUSSEL, J. B. Management of thrombocytopenia. *F1000 Prime Reports*, v. 6, n. 45, p. 1-10, 2014.
- KRETLI, W. S. C.; MOTA, B. C.; ANDRADE, G. H. A.; GONTIJO, J. R.; SILVA, J. R.; LOPES, J. H. M.; LAFETÁ, L.; BRANDÃO, L. I.; ALVES, L.; SILVA, R. P. Púrpura trombocitopênica idiopática: etiopatogênese, diagnóstico e tratamento em adultos. *Revista Médica de Minas Gerais*, v. 21, p. 7-10, 2011.
- LEWIS, D. C.; MEYERS, K. M. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 10, p. 207-218, 1996.
- LITTLEWOOD, J. D. Doenças Sanguíneas e dos órgãos hematopoiéticos. In: DUNN, J. K. *Tratado de medicina de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 2001. p. 759-813.
- SCOTT, M. A. Immune-mediated thrombocytopenia. In: FELDMAN, V. B.; ZINKL, F. G. *Schalm's veterinary hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2005. p. 478-486.
- WHITLEY, N. T.; DAY, M. J. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 52, p. 70-85, 2011.

# Tratamento de doença de disco intervertebral em cão com fisioterapia e reabilitação veterinária: relato de caso

## Treatment of intervertebral disc disease by physical therapy and rehabilitation in a dog: a case report

### Resumo

A doença do disco intervertebral (DDIV) é a causa mais frequente de lesão medular em cães. Aproximadamente 15% das discopatias em cães acometem a região cervical. A fisioterapia veterinária tem despertado grande interesse nos médicos veterinários, tendo em vista sua importante aplicação, não invasiva, em diversos tratamentos. O objetivo deste trabalho é contribuir com informações referentes à possibilidade de tratamento de cães acometidos pela DDIV cervical com as técnicas de fisioterapia veterinária e relatar o caso de um tratamento bem sucedido, bem como revisar a literatura sobre o tema.

### Summary

The intervertebral disk disease (IDD) is the most common cause of spinal cord injuries in dogs. Approximately 15% of discopathies in dogs affects the cervical region. The veterinary physiotherapy has aroused great interest among clinical veterinarians, in view of the non-invasive treatments in several cases. The objective of this paper is to contribute with more information related to the treatment of dogs affected by cervical IDD by using veterinary physiotherapy techniques and to describe a well succeeded case of treatment, as well as to review the literature related to cervical IDD.

Recebido em 4 de novembro de 2014 e aprovado em 27 de novembro de 2014

Fernanda do Passo Ramalho<sup>1</sup>

Maira Rezende Formenton<sup>2</sup>

José Geraldo Meirelles Palma Isola<sup>3</sup>

Jean Fernandes Guilherme Joaquim<sup>4</sup>

✉ felfys@gmail.com



#### Palavras-chave

Doença do disco intervertebral; fisioterapia veterinária; reabilitação veterinária e hérnia de disco cervical.

#### Keywords

Intervertebral disk disease; veterinarian physiotherapy; veterinarian rehabilitation and cervical disc herniation.

# A

coluna vertebral dos cães, do ponto de vista anatômico e neurofuncional, pode ser dividida em cinco regiões: cervical, torácica, lombar, sacral e caudal (WHEELER; SHARP, 1999). Essa divisão facilita o estudo, a anamnese e a neurolocalização das enfermidades que acometem a medula espinhal dos cães.

A doença do disco intervertebral (DDIV) é a causa mais frequente de lesões na medula espinhal dos cães (BRAY; BURBIDGE, 1998; BRAUND, 1996). Aproximadamente 15% das discopatias em cães acometem a região cervical, sendo a dor o sinal clínico mais evidente (BRAUND, 1986; JANSSENS, 1991; TOOMBS, 1992; GILL; LIPPINCOTT; ANDERSON, 1996; PADILHA FILHO; SELMI, 1999).

A fisioterapia já é bastante difundida na medicina humana, com estudos claros sobre seu benefício terapêutico em diversas enfermidades. Na medicina veterinária, embora haja um uso crescente das técnicas de reabilitação, há relativamente pouca literatura científica que dê suporte ao seu uso. Apesar disso, nos últimos anos, a fisioterapia veterinária tem despertado grande interesse nos médicos veterinários, tendo em vista sua aplicação não invasiva, em diversos tratamentos (LEVINE et al., 2008).

### Doença do disco intervertebral cervical em cães

A DDIV cervical é a segunda desordem do gênero mais comum em cães com acometimento do disco intervertebral. Em 90% dos

1 M.V. Msc. Veterinária Autônoma FR.VET

2 M.V. Mestranda VCI/FMVZ/USP, Instituto Bioethicus, Físioanimal

3 M.V. Msc. Veterinário Autônomo capesvet

4 M.V. Msc. Instituto Bioethicus

animais com doença discal cervical, um dos quatro espaços cervicais craniais está envolvido. Os sinais clínicos podem variar desde a fraqueza muscular, espasticidade dos membros do mesmo lado do corpo (hemiparesia), passando pela debilidade de todos os membros (tetraparesia), até a paralisia dos quatro membros (tetraplegia). Espasmos cervicais, dor à palpação, rigidez cervical e relutância em flexionar ou estender a cabeça e pescoço são aspectos básicos da DDIV cervical (BRAUND, 1986).

A etiologia da DDIV até os dias de hoje ainda é imprecisa. Sabe-se que a causa da enfermidade é a degeneração do DIV. Essa degeneração pode ser fibroide ou condroide. O que leva a esse quadro ainda é motivo de pesquisa, embora traumas, desidratação dos discos por sedentarismo ou hipomobilidade e condrodistrofias estejam entre causas já estabelecidas (BRAUND, 1996).

O diagnóstico presuntivo é baseado na história clínica do paciente e por meio de exames físico e neurológico. O diagnóstico definitivo é obtido com o auxílio de exames complementares de imagem (radiografia simples, mielografia, tomografia computadorizada e ressonância magnética). Exames complementares (hemograma, bioquímicos séricos e análises do líquido cefalorraquidiano) são interessantes para excluir outras doenças que apresentam sinais clínicos semelhantes (TOOMBS; BAUER, 1998).

Os tratamentos da DDIV variam de acordo com a gravidade e consistem essencialmente em medicamentoso ou cirúrgico. Independentemente do tratamento de escolha, a associação com as técnicas de fisioterapia e reabilitação veterinária podem gerar efeitos benéficos desejáveis (BRISSEON, 2010; LECOUTEUR; GRANDY, 2004).

### Tipos de hérnia de disco

Na maioria dos casos de cães com hérnia discal, o problema é oriundo de uma extrusão do disco, ao invés de protrusão (CHERRONE et al., 2004). Tanto a protrusão como a extrusão podem ocorrer nos três sentidos: ventral, dorsal ou lateral, embora o sentido dorsal seja o mais comumente encontrado (TOOMBS; BAUER, 1998; LECOUTEUR; GRANDY, 2004).

A hérnia de Hansen tipo I é a saída do núcleo após a ruptura do anel fibroso dorsal. A hérnia de Hansen tipo II é a ruptura parcial da região dorsal do anel fibroso, gerando uma protrusão do núcleo pulposo em sua direção. Mais recentemente foi descrito um terceiro tipo de hérnia de disco, a hérnia de Hansen tipo III. Esse tipo é caracterizado por uma extrusão de apenas parte do núcleo pulposo, porém em alta velocidade gerando lesão à medula sem causar compressão (LAHUNTA; GLASS, 2009).

### Sintomas e diagnóstico da DDIV cervical

O sinal clínico mais frequente e característico da DDIV da coluna cervical é a dor. O posicionamento de cabeça baixa, orelhas para trás, pescoço rígido, locomoção cautelosa e espasmos dos músculos da coluna cervical são as manifestações clínicas da dor cervical mais comumente observadas. Os sintomas podem aparecer de forma aguda, mas a severidade aumenta com o decorrer dos dias ou das semanas. A dor pode ser refratária ao tratamento medicamentoso. Os cães que possuem lesões do disco intervertebral cervical exibem sinais de disfunção medular, variando de leve ataxia a tetraparesia (COATES, 2000).

Nos exames neurológicos, é necessária a verificação da propriocepção consciente, sendo que quase todos os pacientes respondem de forma negativa a esse teste (JURINA; GREVEL, 2001).

O diagnóstico preciso somente pode ser realizado no caso de suspeitas de enfermidades cervicais com o emprego de exames de diagnóstico por imagem, como a radiografia, mielografia, tomografia computadorizada e a ressonância magnética (OLMSTEAD, 1995; TOOMBS; BAUER, 1998).

### Tratamento

O tratamento mais apropriado vai depender do quadro clínico do paciente e como ele se apresenta nos exames físico e neurológico, assim como da duração do processo (LECOUTEUR; GRANDY, 2004).

As formas principais de tratamento são as “conservadoras” (tratamento clínico e reabilitação) e cirúrgicas, como a fenestração e a descompressão ventral. O tratamento clínico conservador sem o auxílio das técnicas de fisioterapia e reabilitação pode ter êxito, mas a recuperação pode ser muito longa e 36% dos cães apresentarão recidivas (RUSSELL; GRIFFITHS, 1968).

A necessidade do tratamento cirúrgico está sempre baseada na severidade e na duração dos sinais clínicos, no déficit neurológico acentuado e progressivo, na dor constante e no insucesso do tratamento conservativo (SIMPSON, 1992). O tratamento não cirúrgico deverá ser adotado quando se tratam de lesões leves ou em estágios iniciais da doença (RUSSELL; GRIFFITHS, 1968).

A fisioterapia veterinária se realizará de forma programada com o auxílio de agentes físicos, massagens, exercícios distintos e hidroterapia, conforme as características e a severidade da patologia de cada paciente (MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004).

### Tratamento clínico conservativo e cirúrgico

O tratamento clínico conservativo pode combinar repouso em ambientes restritos, reabilitação física, e a

prescrição de medicamentos, como analgésicos, relaxantes musculares e antiinflamatórios não esteroides ou glicocorticoides (DEWEY, 2003).

Muitos autores ressaltam a importância do repouso em gaiola, que consiste em manter o cão o tempo todo em uma área limitada pequena durante seis semanas, permitindo assim a cicatrização do ligamento longitudinal caudal e prevenindo possíveis herniações adicionais (COATES, 2000; DEWEY, 2003).

O tratamento cirúrgico é indicado para animais que apresentem episódios recorrentes da DDIV cervical, aos que não respondem ao tratamento conservativo, ou quando há dor persistente e déficit neurológico moderado ou severo (OLSSON, 1952; CHIERICHETTI; ALVARENGA, 1999).

Existem diferentes técnicas cirúrgicas para abordar a DDIV cervical, entre elas citam-se: a descompressão ventral (FITCH; KERWIN; HOSGOOD, 2000), a fenestração de disco (FRY et al., 1991), a laminectomia dorsal e a hemilaminectomia (ROSSMEISL et al., 2005).

### Fisioterapia e Reabilitação

O objetivo da fisioterapia em pacientes com déficits neurológicos é conseguir a recuperação dos tecidos nervosos lesionados, chegando o mais próximo possível da normalidade, prevenir o desenvolvimento da atrofia muscular, melhorar a função dos membros paréticos e/ou paralisados e prevenir o desenvolvimento de contraturas e de fibrose nos tecidos moles. Se aplicada em conjunto com a terapêutica médica e cirúrgica, pode proporcionar uma recuperação mais rápida e completa (FOSSUM et al., 2007).

Pedro e Mikail (2009) relataram que, durante toda a fase inicial da reabilitação, o paciente deve ser mantido em repouso, uma vez que isso pode reduzir a dor e a inflamação da raiz nervosa.

A fisioterapia pode ser iniciada 48 horas após a cirurgia. Já em pacientes submetidos ao protocolo médico, a cinesioterapia ativa não deve ser iniciada pelo menos nas duas semanas seguintes ao aparecimento dos sinais clínicos, pois uma excessiva mobilização física pode levar à extrusão de mais material de disco (LECOUTEUR; GRANDY, 2004; MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004).

Algumas modalidades de tratamento podem ser relativamente simples de serem realizadas em casa e pelo próprio proprietário do animal, o que é menos um fator de estresse para o animal; outras requerem técnicas mais apuradas e equipamentos específicos, devendo ser realizadas por profissionais habilitados (MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004).

### Alongamentos

O alongamento muscular é indicado quando a amplitude de movimento está limitada, comprometendo o desempenho funcional (POLIZELLO et al., 2009).

Técnicas de alongamento são, frequentemente, realizadas em conjunto com exercícios de amplitude de movimento para melhorar a flexibilidade das articulações e a extensibilidade dos tecidos periarticulares dos músculos e dos tendões (MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004).

### Massagens

A massagem ajuda na recirculação de líquidos intersticiais para os vasos linfáticos, e do sangue e linfa das extremidades para suas circulações principais. É provável que ajude também na circulação sanguínea dos tecidos lesionados, melhorando o transporte de nutrientes para a sua reparação; o que previne ou reduz a formação de tecidos fibrosos, e ajuda na remoção dos produtos das reações inflamatórias, prevenindo assim as dores crônicas. Em doentes com déficits neurológicos, é importante para reduzir a ocorrência de espasmos musculares, preservar a mobilidade e flexibilidade dos membros e estimular a recuperação da sensibilidade (MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004; FOSSUM et al., 2007).

### Mobilização articular

A imobilização de uma articulação é prejudicial para a saúde da cápsula articular, dos ligamentos, dos ossos e dos músculos a ela associados. Na mobilização de uma articulação são efetuados todos os movimentos de forma passiva e sem provocar dor ao paciente. O objetivo é a manutenção da integridade da articulação ao minimizar as contraturas de tecidos moles e músculos, as lesões da cápsula articular (a mobilização da articulação promove a circulação do líquido sinovial para melhorar a nutrição da cartilagem) e a atrofia muscular resultantes da paralisia do membro; além de melhorar a circulação sanguínea do membro e aumentar a sensibilidade (FOSSUM et al., 2007).

### Eletroestimulação

A eletroestimulação resulta da aplicação de uma corrente elétrica, gerada por um estimulador, aos músculos inervados por um nervo motor, com o emprego de eletrodos colocados na pele, causando a despolarização do referido nervo e conseqüente contração muscular. É frequentemente utilizada para a reabilitação de pacientes com patologia muscular ou neurológica (MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004; FOSSUM et al., 2007).

Outra modalidade de eletroterapia utilizada na reabilitação da coluna cervical é o TENS (em inglês, *Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation*). É indicado principalmente

para o alívio da dor, pois pode promover boa analgesia e pode ser utilizado diariamente (PEDRO; MIKAIL, 2009).

### Laser terapêutico

Tem uma excelente indicação para dor e ação anti-inflamatória, auxiliando a reduzir a utilização de medicamentos que, no longo prazo, poderiam causar diversos efeitos colaterais. O laser é aplicado de forma pontual no local da lesão. As radiações do laser aceleram a cicatrização por atrair um maior número de fibroblastos, aumentar a produção de colágeno e estimular a microcirculação. Nos casos de pacientes acometidos pela DDIV cervical o laser é também indicado por promover analgesia com a redução da condução das fibras axonais C (de condução lenta dos impulsos nervosos), responsáveis pela dor crônica persistente (PEDRO; MIKAIL, 2009).

### Termoterapia

O calor tem ação vasodilatadora, aumenta a velocidade de condução dos impulsos nervosos, causa relaxamento muscular, eleva o limiar da dor, aumenta as atividades enzimática e metabólica e aumenta a extensibilidade do tecido conectivo. O calor é o agente terapêutico de eleição em lesões crônicas (FOSSUM et al., 2007).

As técnicas de aquecimento podem ser aplicadas cerca de quatro horas antes da mobilização, estiramento das articulações e dos exercícios terapêuticos, pois aumentam a elasticidade dos tecidos e a mobilidade das articulações (FOSSUM et al., 2007).

### Cinesioterapia

Os objetivos dos exercícios terapêuticos incluem a prevenção das disfunções, a melhora, a restauração ou a manutenção da normalidade da força, da mobilidade, da flexibilidade e da coordenação. Os exercícios terapêuticos são incrementados de acordo com a evolução do quadro clínico e a estabilização da coluna cervical (PEDRO; MIKAIL, 2009).

### Hidroterapia

A hidroterapia é a execução de exercícios dentro da água com o objetivo de aumentar a massa e força muscular, a mobilização ativa das articulações e a agilidade dos membros, sem que se exerça força direta sobre as estruturas ósseas e articulações (WHEELER; SHARP, 1999; MILLIS; LEVINE; TAYLOR, 2004; FOSSUM et al., 2007).

Em animais que sofrem da DDIV cervical, a hidroterapia deve ser utilizada com cautela, em fases mais avançadas do tratamento, sendo contraindicada em casos de dor aguda (PEDRO; MIKAIL, 2009). Em animais tetraparéticos há sérios riscos de afogamento ou pneumonia por aspiração de água se não forem tomados os devidos cuidados.

### Objetivos

Os objetivos deste trabalho são contribuir com informações referentes à possibilidade de tratamento de cães acometidos pela DDIV cervical com as técnicas de fisioterapia veterinária, relatar o caso de um tratamento bem sucedido, bem como revisar a literatura sobre o tema.

### Relato de caso

Um animal da espécie canina, sem raça definida (SRD), fêmea, com aproximadamente seis anos de idade e pesando 15,2 Kg, no dia 30 de outubro de 2012, com o quadro clínico: cabeça baixa, orelhas para trás, pescoço rígido, dificuldade de locomoção, espasmos dos músculos da coluna cervical, hiporexia, vocalização e outros sintomas indicativos de dor aguda.

De acordo com o histórico do animal, vivia em apartamento com piso de textura lisa e submetida ao convívio com escadas por aproximadamente três anos. Apesar de possuir um comportamento calmo e não ter o hábito de correr e pular no piso liso com frequência, a paciente tinha a rotina de subir e descer as escadas de um prédio de três andares, em média, três vezes ao dia.

A avaliação clínica, apoiada em exames físicos, ortopédicos e neurológicos, revelou características físicas indicativas de uma genética condrodistrófica, espasmos musculares na região cervical, reações de dor aguda, propriocepção consciente ausente nos quatro membros, estado mental deprimido, debilidade generalizada, tetraparesia, dor profunda presente nos quatro membros e a localização da lesão foi presumida de estar na região cervical cranial abaixo do forame magno.

A paciente foi encaminhada para o exame radiográfico onde foi constatada por meio da projeção latero-lateral a redução de espaço intervertebral entre C5 e C6, sugestivo de hérnia de disco, e uma calcificação entre C3 e C4 (Figura 1 - (A), (B)).

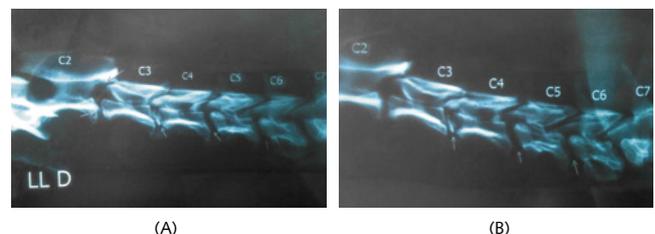


Figura 1 – (A), (B): Imagens radiográficas na projeção latero-lateral evidenciando redução de espaço intervertebral entre C5 e C6, sugestivos de hérnia de disco, e calcificação entre C3 e C4. Fonte: Ramalho et al (2014).

O tratamento clínico prescrito foi a utilização do anti-inflamatório não esteroide firocoxib, na dose de 5mg/Kg de peso corporal, uma vez ao dia, durante 10 dias consecutivos. Para analgesia foi prescrito a associação dos fármacos: cloridrato de tramadol 1mg/Kg a cada 8 horas,

dipirona sódica 30mg/Kg a cada 6 horas e gabapentina 5mg/Kg a cada 12 horas, durante 10 dias. No caso da gabapentina, o desmame necessário do fármaco foi realizado da seguinte forma: durante os 10 primeiros dias de tratamento foi administrada a dose de 5mg/Kg, passando para 3,5mg/Kg por mais cinco dias, seguido de 2mg/Kg por três dias e finalizando com 0,5mg/Kg por mais três dias. Também foram prescritos protetores da mucosa gástrica, como o omeprazol, na dose de 1mg/Kg e ranitidina, na dose de 2mg/Kg.

O tratamento fisioterápico foi determinado em três fases, de acordo com a evolução da paciente. Na primeira fase, foram prescritas três sessões semanais, durante duas semanas consecutivas. Nesse período, foi solicitado o repouso absoluto. Nessas sessões da primeira fase, foram realizados alongamentos (Figura 2 - (A), (B)), massagens e mobilizações articulares passivas (de acordo com o limite de dor da paciente); além da aplicação do laser terapêutico infravermelho de comprimento de onda de 808nm, sendo 14 Joules por ponto de tratamento, a cada 48 horas, nas saídas das raízes nervosas; termoterapia com aplicação de luz infravermelha com o propósito de obter relaxamento muscular, elevar o limiar de ativação de receptores neurológicos de dor e diminuição dos espasmos musculares (Figura 3 - (A), (B)); e aplicações de TENS na frequência de 90 Hz, com corrente de 20 mA, durante 20-30 minutos, três vezes na semana para obtenção de uma melhor analgesia.



**Figura 2** – (A), (B): Exercícios de alongamento e de amplitude de movimento na primeira fase do tratamento fisioterápico  
Fonte: Ramalho et al (2014)



**Figura 3** – (A), (B): Aplicação de laser terapêutico e de luz infravermelha (termoterapia).  
Fonte: Ramalho et al (2014)

Após essas duas semanas, a paciente foi reavaliada e considerada apta a passar para a segunda fase de tratamento. Nesse momento, a paciente já não apresentava mais a dor aguda e a medicação já havia sido removida (com exceção da gabapentina), sendo mantida, apenas, a dipirona sódica, a cada oito horas, para um auxílio no controle da dor.

Nessa segunda fase, foram prescritas duas sessões semanais por mais duas semanas de tratamento. Nessas sessões, foram realizados alongamentos, massagens, mobilizações articulares passivas e foram adicionados exercícios terapêuticos de estação assistida e exercícios isométricos controlados (com a utilização de prancha e bola). Nessa fase, foi reduzida a quantidade de Joules na aplicação do laser infravermelho, sendo utilizados seis Joules com um caráter anti-inflamatório e a utilização do TENS foi mantida da mesma forma para analgesia, nos finais das sessões.

No final dessas duas semanas de tratamento em segunda fase, foi efetuada uma nova reavaliação e a paciente passou para a terceira e última fase do tratamento. Nessa etapa, ela já conseguia levantar-se e locomover-se, apesar de ainda persistir uma deficiência proprioceptiva e de ainda manter uma postura de pescoço baixo (Figura 4). A paciente já não utilizava nenhuma medicação e já não estava mais sendo mantida em repouso absoluto, apesar de estar restrita a atividades em pisos de textura lisa.



**Figura 4** – Paciente entrando na terceira fase do tratamento de reabilitação com considerável melhora clínica, porém ainda com déficit proprioceptivo e postura de pescoço baixo.  
Fonte: Ramalho et al (2014).

Na terceira fase, foi determinada a manutenção de duas sessões semanais, por mais duas semanas, passando a uma única sessão por semana, por mais duas semanas, totalizando mais quatro semanas de tratamento. A paciente passou a realizar caminhadas assistidas, caminhadas em pistas de propriocepção e os exercícios terapêuticos foram mantidos.

Ao final dessa terceira fase, a paciente não apresentava mais déficit proprioceptivo e nenhum outro

sintoma indesejável; sendo assim considerada de alta do tratamento com a ressalva da indicação de uma manutenção quinzenal.

Concomitantemente ao início do tratamento fisioterápico, instituíram-se sessões de acupuntura semanais. As sessões de acupuntura foram realizadas durante quatro semanas (total de quatro sessões). Após a quarta sessão, por cautela, esse procedimento foi suspenso, uma vez que a paciente passou a rejeitá-lo, ficando excessivamente nervosa durante a sua execução.

## Discussão

Grande parte dos autores é unânime em afirmar que a DDIV é a causa mais comum de injúrias à medula espinhal no cão; sendo que as alterações degenerativas são mais frequentes nas regiões cervicais, bem como nas últimas vértebras torácicas e lombares (BRAUND, 1986; JANSSENS, 1991; TOOMBS, 1992; BRAUND, 1996; BRAY; BURBIDGE, 1998; PADILHA FILHO; SELMI, 1999; LECOUTEUR; GRANDY, 2004; BRISSON, 2010). Esse dado reafirma a importância da realização de estudos que colaborem com informações sobre a fisioterapia e a reabilitação veterinária sendo empregadas em tratamentos de cães acometidos pela DDIV cervical, para que, assim, se aumente a taxa de sucesso e o índice de recuperação desses pacientes.

Levine et al. (2008) relatam que, nos últimos anos, os veterinários têm apresentado um maior interesse pela especialidade da fisioterapia veterinária e isso tem aumentado à medida que são divulgados novos relatos de reabilitações bem sucedidas.

Brisson (2010) e Fossum et al. (2007) referem que, independentemente do tratamento de escolha (conservativo ou cirúrgico), a associação com as técnicas de fisioterapia e reabilitação veterinária podem gerar efeitos benéficos desejáveis ao paciente portador da DDIV cervical.

Pedro e Mikail (2009) destacam que um período breve de uma a duas semanas de repouso em ambiente restrito é aconselhado para pacientes acometidos pela DDIV cervical. No presente relato, foi verificado que, para a paciente, o repouso nas duas primeiras semanas foi imprescindível para uma boa recuperação e para o sucesso do tratamento. Porém, o repouso não inviabilizou o início prematuro das sessões de fisioterapia, evitando-se assim a ocorrência de efeitos indesejáveis do repouso rígido prolongado, tais como a atrofia muscular, o desenvolvimento de contraturas ou o agravamento na perda das funções dos membros parésicos, como descrito por Fossum et al. (2007).

Millis, Levine e Taylor (2004) ressaltam a importância da realização das sessões de fisioterapia de curta duração,

diariamente, em pacientes acometidos pela DDIV cervical. No caso relatado, a paciente não foi submetida a tratamento diário, e tal decisão foi tomada devido ao quadro de dor aguda que inviabilizava a manipulação constante da paciente. Após a primeira fase do tratamento, a paciente foi reavaliada e não foi verificada a necessidade da instituição de uma rotina diária de sessões, uma vez que ela estava respondendo de maneira gradual e benéfica com os dias de repouso intercalados às sessões.

Fossum et al. (2007) afirmam que a termoterapia profunda não deve ser aplicada em áreas com processos de inflamação aguda. Na paciente do presente relato de caso, a termoterapia utilizada foi superficial, por meio da aplicação da luz infravermelha na fase inicial do tratamento, onde havia um processo inflamatório agudo. Esse procedimento teve um efeito benéfico, pois promoveu a redução do espasmo muscular; o que contribuiu para o sucesso da analgesia. Após essa fase aguda, a termoterapia superficial continuou sendo empregada antes dos exercícios terapêuticos, aumentando a elasticidade dos tecidos e a mobilidade das articulações.

Wheeler e Sharp (1999) afirmam que o prognóstico de um animal acometido pela DDIV cervical varia de acordo com a gravidade, a duração da doença e dos déficits neurológicos existentes. A idade e o peso do animal são fatores prognósticos do tempo de recuperação. No caso da paciente aqui descrita, os déficits neurológicos observados foram proprioceptivos, parestesia dos quatro membros e diminuição da sensibilidade superficial e da sensibilidade profunda. Com o emprego de tais parâmetros, a gravidade da DDIV cervical aqui relatada foi considerada como leve-moderada.

## Considerações finais

Um programa de reabilitação apropriado e específico às necessidades do animal é fundamental para o plano de tratamento de cães com hérnia de disco cervical. Para isso se deve considerar a origem do problema; a gravidade e as causas dos sinais clínicos; a progressão da doença (aguda ou crônica) e a participação do animal; e, principalmente, o envolvimento do proprietário no plano de reabilitação. 

## Referências

- BRAUND, K. G. **Clinical syndromes in veterinary neurology**. Baltimore: Williams e Wilkins, 1986. 257 p.
- BRAUND, K. G. Moléstia do disco intervertebral. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismos da moléstia na cirurgia dos pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1996. 1446 p.
- BRAY, J. P.; BURBIDGE, H. M. The canine intervertebral disk: part one: structure and function. **Journal of the American Hospital Association**, v. 34, n. 1, p. 55-63, 1998.
- BRISSON, B. A. Intervertebral disc disease in dogs. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 40, n. 5, p. 829-858, 2010.
- CHERRONE, K. L.; DEWEY, C. W.; COATES, J. R.; BERGMAN, R. L. A retrospective comparison of cervical intervertebral disk disease in nonchondrotyrophoid large dogs versus small dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 316-320, 2004.
- CHIERICHETTI, A. J.; ALVARENGA, J. Afecção degenerativa do disco intervertebral toraco-lombar: revisão. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, n. 22, 1999.
- COATES, J. P. Management of disc associated wobbler syndrome with a partial slot fenestration and position screw technique. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, p. 131-136, 2000.
- DEWEY, C. W. **A practical guide to canine and feline neurology**. Iowa: Blackwell, 2003. 642 p.
- FITCH, R. B.; KERWIN, S. C.; HOSGOOD, G. Caudal cervical intervertebral disk disease in the small dog: role of distraction and stabilization in ventral slot decompression. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 36, p. 68-74, 2000.
- FOSSUM, T. W., HEDLUNG, C. S., JOHNSON, A. L., SCHULZ, K. S., SEIM, H. B., WILLARD, M. D., BAHR, A., CARROLL, G. L. **Small animal surgery**. 3. ed. Missouri: Mosby, 2007.
- FRY, T.; JOHNSON, A.; HUNGERFORD, L.; TOOMBS, J. Surgical treatment of cervical disc herniation in ambulatory dogs. Ventral decompression vs. fenestration, 111 cases (1980-1988). **Progress in Veterinary Neurology**, v. 2, p. 165-173, 1991.
- GILL, P. J.; LIPPINCOTT, C. L.; ANDERSON, S. M. Dorsal laminectomy in the treatment of cervical intervertebral disk disease in small dogs: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, p. 77-80, 1996.
- JANSSENS, L. A. A. Mechanical and pathophysiological aspects of acute spinal cord trauma. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, n. 11, p. 572-578, 1991.
- JURINA, K.; GREVEL, V.; Cervical disk protrusion in dogs. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K Klientiere Heimtiere**, v. 30, n. 3, p. 192-201, 2001.
- LAHUNTA, A.; GLASS, E. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. 3. ed. Missouri: Elsevier, 2009. 552 p.
- LECOUTEUR, R. A.; GRANDY, J. L. Doenças da medula espinhal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.) **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, p.644-694, 2004.
- LEVINE, D.; MILLIS, D. L.; MARCELLIN-LITTLE, D. J.; TAYLOR, R. **Reabilitação e fisioterapia na prática de pequenos animais**. São Paulo: Roca, p. 1-76, 2008.
- MILLIS, D. L., LEVINE, D.; TAYLOR, R. A. **Canine rehabilitation physical therapy**. St. Louis: Saunders, 2004.
- OLMSTEAD, M. L. The canine cemented modular hip prosthesis. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 2, p. 109-124, 1995.
- OLSSON, S. E. Observations concerning disc fenestration in dogs. **Acta Orthopedic Scandinavia**, Basingstoke, v. 20, p. 349-356, 1952.
- PADILHA FILHO, J. G.; SELMI, A. L. Discopatia cervical no cão. Tratamento cirúrgico através de fenestração ventral. Estudo retrospectivo (1986-1997). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 1, p. 75-78, 1999.
- PEDRO, C. R.; MIKAIL, S. **Fisioterapia veterinária**. 2. ed. Barueri, SP: Manole, 2009.
- POLIZELLO, J. C.; CARVALHO, L. C.; FREITAS F. C.; PADULA, N.; SHIMANO A. C.; MATTIELO-SVERZUT, A. C. Propriedades mecânicas do músculo gastrocnêmio de ratas imobilizadas e posteriormente submetidas a diferentes protocolos de alongamentos. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 15, n. 3, 2009.
- ROSSMEISL, J. H.; LANZ, O. I.; INZANA, K. D.; BERGMAN, R. L. A modified lateral approach to the canine cervical spine: procedural description and clinical application in 16 dogs with lateralized compressive myelopathy or radiculopathy. **Veterinary Surgery**, v. 34, p. 436-444, 2005.
- RUSSELL, S. W.; GRIFFITHS, R. C. Recurrence of cervical disc syndrome in surgically and conservatively treated dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 153, p. 1412-1416, 1968.
- SIMPSON, A. R. Anterior cervical discectomy without fusion. **Virginia Medical**, Richmond, v. 106, p. 297, 1992.
- TOOMBS, J. P. Cervical intervertebral disk disease in dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 14, p. 1477-1488, 1992.
- TOOMBS, J. P.; BAUER, M. S. Afecção do disco intervertebral. In: SLATTER, D. (Ed.) **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2. ed. São Paulo: Manole, v. 1, p. 1286-1305, 1998.
- WHEELER, S. J.; SHARP, N. J. H. **Diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções espinhais do cão e do gato**. São Paulo: Manole, 1999. 224 p.

# Fístula abomaso-umbilical em bezerro: relato de caso

## Abomasal-umbilical fistula in calf: a case report

### Resumo

Dentre as enfermidades congênitas e traumáticas observadas em bezerros, destacam-se as hérnias umbilicais, nas quais órgãos abdominais podem compor o seu conteúdo herniário, sofrendo estrangulamento e necrose. Nesse sentido, o envolvimento do abomaso é raro, porém quando presente nota-se a formação de fístula abomaso-umbilical. Por ser a fístula abomaso-umbilical incomum e devido aos trabalhos científicos serem poucos sobre o assunto, o objetivo do presente relato é descrever o caso de um bezerro com emagrecimento progressivo e drenagem de secreção láctea através de um orifício umbilical. Após instituição do tratamento cirúrgico, o paciente obteve melhora clínica significativa, não demonstrando até o presente momento (um ano e quatro meses após a cirurgia) sintomatologia clínica correlacionada. Não obstante, ressaltar importantes pontos acerca dessa onfalopatia, pois o diagnóstico e o tratamento precoces podem contribuir para melhorar a qualidade de vida e sobrevivência dos animais afetados.

### Summary

Among the congenital and traumatic diseases observed in calves there are the umbilical hernias, in which abdominal organs may select their hernia contents, suffering strangulation and necrosis. In this sense, the involvement of the abomasum is rare, but when present it is noted the formation of abomasal-umbilical fistula. Being the rare abomasal-umbilical fistula and due to scientific papers on the subject being scarce, the aim of this report is to describe the case of a calf with progressive weight loss and drainage milk secretion via an umbilical hole. After institution of surgical treatment, the patient had significant clinical improvement, not showing to date (one year and four months after surgery) correlated clinical symptoms. However, emphasize important points about this onfalopatia because the diagnosis and early treatment can contribute to improving the quality of life and survival of affected animals.

Recebido em 13 de outubro de 2014 e aprovado em 5 de janeiro de 2015

Henrique Alves Rodrigues<sup>1</sup>

Rafael de Mello Alves<sup>1</sup>

Karina Calciolari<sup>2</sup>

Vítor Foroni Casas<sup>3</sup>

Fernanda Gosuen Gonçalves Dias<sup>3</sup>

Lucas de Freitas Pereira<sup>3</sup>

Avenida Armando Salles de Oliveira, 201 – Parque Universitário

CEP 14404-600 – Franca-SP – Brasil

✉ lucapeira@gmail.com

☎ (16)3711-8780



#### Palavras-chave

Abomaso. Bovino.  
Herniorrafia. Onfalopatia.

#### Keywords

Abomasum. Bovine.  
Herniorrhaphy. Onfalopatia.

**E**m bovinos, o cordão umbilical é formado por veia, artérias e úraco, os quais apresentam comunicação direta com o fígado, artérias ilíacas e bexiga do feto, respectivamente (SHARMA, 2011). Essas estruturas são envolvidas por uma substância chamada de gelatina de Wharton (formada por tecido conjuntivo indiferenciado e composta de mucopolissacarídeos, fibroblastos e macrófagos). Durante a fase fetal, o cordão umbilical é responsável por partilhar trocas gasosas e nutrientes essenciais entre feto e gestante, além de eliminar os catabólitos fetais (RINGS, 1995).

Poucos dias após o nascimento, as artérias e veia presentes no cordão umbilical do filhote se colabam; a musculatura e a pele se unem, fazendo com que o umbigo perca totalmente a sua funcionalidade inicial, tornando-se um remanescente da ligação materno fetal (RINGS, 1995).

Problemas durante essa involução podem desencadear as onfalopatias que, em bezerros, representam um dos principais problemas na pecuária brasileira (REIS et al., 2009). Entre as inúmeras causas dessas afecções, citam-se os fatores ambientais, higiênicos, congênitos, infecciosos, inflamatórios e traumáticos, que, isolados ou em associação, podem causar danos locais e sistêmicos (SHARMA,

1 Centro de Ciências Naturais e Humanas (CCNH), Universidade Federal do ABC

2 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Departamento de Reprodução Animal

3 Docente do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade de Franca

2011). Representam importante causa de mortalidade (10% em animais com até oito meses de idade), principalmente nos casos que progridem para septicemia aguda ou crônica (REIS et al., 2009).

Dentre as onfalopatias mais frequentes na espécie bovina, destacam-se as hérnias umbilicais (RINGS, 1995; SILVA et al., 2012), de etiologia congênita ou adquirida. Não há relatos sobre a predisposição racial e sexual (REIS et al., 2009) e os sinais clínicos mais comumente observados em bezerros são aumento de volume e sensibilidade na região umbilical, e baixo desenvolvimento corporal (RINGS, 1995). O diagnóstico deve ser baseado na anamnese, sinais clínicos e exame físico do paciente acometido. Na palpação abdominal, é observada a presença do anel herniário umbilical com órgãos abdominais diversos, formando o conteúdo herniário (principalmente alças intestinais), o qual é envolto pelo saco herniário (RINGS, 1995).

O aprisionamento do abomaso no anel herniário umbilical (fístula abomaso-umbilical ou hérnia abomaso-umbilical) pode acontecer em bezerros. Entretanto, é grave e raro o encarceramento e necrose de tal estrutura (SHARMA, 2011; ALVES et al., 2013), o que pode proporcionar perdas consideráveis da ingesta e de eletrólitos através da fístula, causando desidratação grave e desnutrição, diminuindo assim a qualidade de vida e sobrevivência do animal (SANGWAN et al., 2011). Os animais com fístula abomaso-umbilical podem apresentar apatia, inapetência, desidratação, febre, desnutrição, peritonite, fragilidade da musculatura abdominal, motilidade ruminal alterada, gotejamento de substância leitosa na região umbilical com grumos e odor típico de leite fermentado (NEWCOMB; MORTON, 1970; FIELD, 1988; ALVES et al., 2013).

O tratamento de eleição é o cirúrgico (NEWCOMB; MORTON, 1970; SANGWAN et al., 2011; SHARMA, 2011), o qual requer ressecção do abomaso fistulado, incluindo abomasectomia parcial na curvatura maior para remover o tecido comprometido (VERTENTEN et al., 2009).

Diante da rara ocorrência da fístula abomaso-umbilical, o intuito do presente trabalho é relatar o caso de um



Figura 1 – Imagem fotográfica de bezerro subnutrido, demonstrando gotejamento de líquido esbranquiçado da região umbilical (seta). Fonte: (ARQUIVO PESSOAL, 2014)



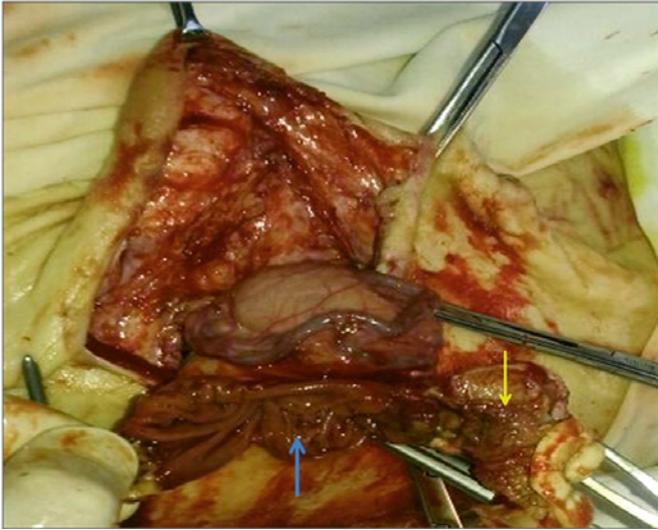
Figura 2 – Imagem fotográfica de fístula abomaso-umbilical em bezerro (seta). Fonte: (ARQUIVO PESSOAL, 2014).

bezerro com tal afecção, enfatizando a importância do diagnóstico e tratamento precoces na qualidade de vida e sobrevivência dos pacientes.

### Relato de caso

Foi atendido um bezerro, sem raça definida, quatro meses de idade, pesando 75 kg, com histórico de que há dois meses apresentava subnutrição e gotejamento constante de líquido esbranquiçado na região umbilical (Figura 1), principalmente após a mamada.

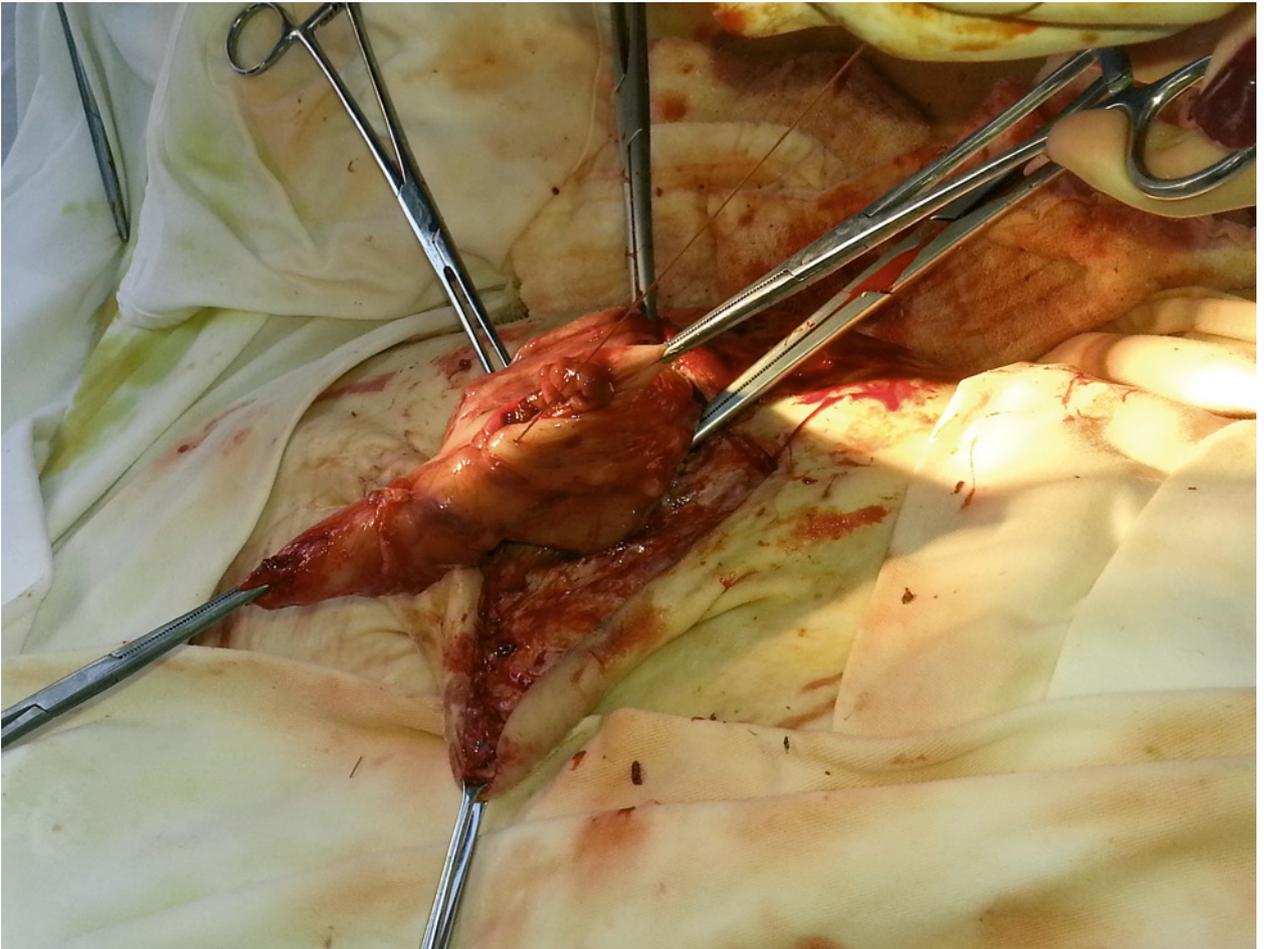
Durante o exame físico observou-se fístula umbilical (Figura 2) de aproximadamente três centímetros, drenando líquido de aspecto e odor semelhantes a leite fermentado. Na palpação da fístula, notou-se presença de estrutura lisa com pregas longitudinais, idênticas às do abomaso. Os exames laboratoriais (hemograma, função renal e hepática) estavam



**Figura 3** – Imagem fotográfica de cavidade abdominal de bezerro no trans-cirúrgico de herniorrafia, demonstrando presença do abomaso como conteúdo da hérnia umbilical (seta azul) com área fibrosada (seta amarela). Fonte: (ARQUIVO PESSOAL, 2014)

dentro dos limites fisiológicos para a espécie, exceto por discreta anemia e leucocitose.

Perante a suspeita de fístula abomaso-umbilical, sugeriu-se correção cirúrgica da mesma; para tanto, o animal foi submetido a jejum sólido e hídrico, sedado com cloridrato de xilazina (0,1mg/kg, por via intramuscular) e realizado bloqueio infiltrativo local com lidocaína sem vasoconstritor (7mg/kg), após antissepsia da região. Seguindo as recomendações de Baird (2008), procedeu-se a incisão elíptica ao redor da abertura da fístula, sendo possível a identificação do órgão acometido (abomaso) e divulsão completa deste tecido do anel herniário, removendo todas as aderências. Ato contínuo, o abomaso foi exteriorizado (Figura 3) e efetuada a remoção da porção fibrosada, com posterior sutura do órgão (fio catgut cromado 1 em padrão Cushing duplo) para restauração da continuidade intestinal seguida de omentopexia (Figura 4).



**Figura 4** – Imagem fotográfica de omentopexia após a sutura do abomaso para resolução de fístula abomaso-umbilical em bezerro. Fonte: (ARQUIVO PESSOAL, 2014).

Após lavagem abundante da cavidade abdominal com solução fisiológica aquecida, realizou-se herniorrafia (fio nylon 1, padrão de sutura Mayo vertical (jaquetão)). A redução do subcutâneo foi realizada com fio catgut cromado 1 e padrão de sutura simples contínuo. A dermorráfia foi feita com grampos de Michel estéreis.

Não houve modificações na alimentação do paciente naquele período, que permaneceu mamando normalmente logo no dia seguinte à cirurgia. No pós-operatório, o animal permaneceu internado e foi medicado com amoxicilina trihidratada (5,75mg/kg, via intramuscular, a cada 24 horas, durante 3 dias) e flunixin meglumine (1,1mg/kg, intramuscular, a cada 24 horas, por 3 dias consecutivos). A limpeza da ferida cirúrgica foi efetuada com solução fisiológica e iodo povidine e, ao redor da mesma, utilizou-se repelente (via tópica, a cada 12 horas, durante 15 dias). Não houve nenhuma intercorrência médica nesse intervalo de tempo.

Os grampos de Michel foram removidos no 15º dia após a cirurgia, quando os bordos cutâneos já estavam coalescentes. Na mesma data, o animal teve alta hospitalar e até o presente momento (um ano e quatro meses após cirurgia) não demonstrou indícios de recidiva ou qualquer outra sintomatologia clínica correlacionada à fistula. Acompanhamentos periódicos do paciente serão realizados para a análise da evolução do caso.

### Discussão e conclusão

O mecanismo patofisiológico de ocorrência das hérnias abdominais ainda não está totalmente elucidado (SANGWAN et al., 2011). Entretanto, estudos apontam como o principal causador os defeitos no metabolismo da matriz colágena e uma maior concentração de colágeno do tipo III, mais fino e flexível quando comparado ao colágeno do tipo I (ALVES et al., 2013).

Tanto em rebanhos leiteiros quanto de carne, as hérnias umbilicais são comuns, causando extensos prejuízos econômicos na pecuária brasileira e mundial (SANGWAN et al., 2011) e, devido ao caráter hereditário, recomenda-se que bovinos portadores dessa enfermidade não sejam utilizados para fins reprodutivos (SILVA et al., 2012). Desse modo, o proprietário foi instruído sobre a importância da orquiectomia, assim que o animal atingisse idade propícia para tal procedimento cirúrgico.

Em bezerros, a fistula abomaso-umbilical é rara (SANGWAN et al., 2011; SHARMA, 2011), principalmente em associação com hérnia umbilical e onfaloflebite (ALVES et al., 2013). Em bovinos adultos, Vertenten et al.

(2009) citaram-na após procedimento cirúrgico de deslocamento de abomaso. Em relação à ocorrência em outras espécies, Sharma (2011) afirmou que pode ser visualizada em búfalos adultos após traumatismos abdominais, porém referiu raridade em animais jovens dessa mesma espécie.

Os sinais clínicos apresentados pelo animal do presente relato coincidiram exatamente com as descrições de Field (1988) e Sangwan et al. (2011), sendo patognomônico a drenagem de conteúdo gástrico pela fístula umbilical, principalmente após a alimentação (NEWCOMB; MORTON, 1970; SHARMA, 2011; ALVES et al., 2013). Em contrapartida, apesar do longo tempo decorrido desde o aparecimento dos sinais (dois meses), o paciente não demonstrava febre, diarreia, peritonite, septicemia, dificuldade de locomoção e/ou anorexia, contrariando os relatos de alguns autores (SANGWAN et al., 2011; ALVES et al., 2013).

O exame físico específico e detalhado da região umbilical foi imprescindível para a confirmação do diagnóstico da enfermidade em questão (REIS et al., 2009) e, apesar de não ter sido realizada no presente caso, Sangwan et al. (2011) mencionaram que a aferição do pH da digesta pode ser outro instrumento diagnóstico, assim como imagens ultrassonográficas abdominais (RINGS, 1995); ambos aliados ao exame clínico específico da região. De acordo com esses mesmos autores, os resultados obtidos em tais exames complementares são pH ácido e definição do órgão e estruturas envolvidas no conteúdo herniário, respectivamente.

No diagnóstico diferencial da fistula abomaso-umbilical, devem ser incluídas algumas onfalopatias, como a hérnia umbilical encarcerada, abscesso umbilical com ou sem peritonite e onfaloflebite (FIELD, 1988).

De fato, as proteínas do leite ingeridas por um bezerro hígido são coaguladas no abomaso pelas enzimas renina e pepsina, garantindo o fracionamento em coágulo. A consistência desse coágulo proporciona fluxo contínuo e lento de nutrientes para o intestino, para serem digeridos e absorvidos. Essas informações justificam a subnutrição do paciente relatado, visto o comprometimento do abomaso (Oliveira; ZANINE; SANTOS, 2007).

A terapia cirúrgica realizada logo após a detecção da fistula abomaso-umbilical foi de suma importância no prognóstico do caso, visto que essa afecção não é passível de resolução somente com condutas conservadoras; o que impossibilita o confronto entre esses distintos tratamentos. Em associação aos resultados cirúrgicos positivos, a ausência de complicações no período, proporcionou o

aumento da sobrevivência do paciente, corroborando com Sharma (2011) e Alves et al. (2013).

É importante ressaltar que, devido à baixa incidência dessa afecção na espécie bovina e a consequente escassez de descrições literárias, alguns parâmetros ainda não estão totalmente esclarecidos (como o estadiamento da doença, modificações nas técnicas cirúrgicas, entre outros), dificultando assim comparações entre autores. 

## Referências

ALVES, E. G. L.; ROSADO, I. R.; MUZZI, L. A. L.; FELICIANO, M. A. R.; FIDELIS JUNIOR, O. L. Fistula abomaso-umbilical em bezerro: relato de caso. *Nucleus Animalium*, v. 5, n. 1, p. 11-14, 2013.

BAIRD, A. N. Umbilical surgery in calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 24, n. 1, p. 467-477, 2008.

FIELD, J. R. Umbilical hernia with abomasal incarceration in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, n. 5, p. 665-666, 1988.

NEWCOMB, R.; MORTON, T. C. A case of abomaso-umbilical fistula in a calf. *The Veterinary Record*, v. 87, n. 1, p. 803, 1970.

OLIVEIRA, J. S.; ZANINE, A. M.; SANTOS, E. M. Fisiologia, manejo e alimentação de bezerras de corte. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v. 10, n. 1, p. 39-48, 2007.

REIS, A. S. B.; PINHEIRO, C. P.; LOPES, C. T. A.; CERQUEIRA, V. D.; OLIVEIRA, C. M. C.; DUARTE, M. D.; BARBOSA, J. D. Onfalopatias em bezerras de rebanhos leiteiros no nordeste do estado do Pará. *Ciência Animal Brasileira*, v. 1, n. 1, p. 29-34, 2009.

RINGS, D. M. Umbilical hernias, umbilical abscesses, and urachal fistulas. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 11, n. 1, p. 137-148, 1995.

SANGWAN, V.; KUMAR, A.; SINGH, K.; MAHAJAN, S. K. Umbilical hernia with abomasal-umbilical fistula in a cow calf. *Vet Scan*, v. 6, n. 1, p. 1-4, 2011.

SHARMA, A. Congenital abomasal fistula in a buffalo calf and its successful treatment. *Buffalo Bulletin*, v. 30, n. 1, p. 1-3, 2011.

SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; SOUZA, L. A.; OLIVEIRA, B. J. N. A.; HELOU, J. B.; FONSECA, A. M.; CARDOSO, L. L.; FREITAS, S. L. R. Tratamento de hérnia umbilical em bovinos. *Ceres*, v. 59, n. 1, p. 39-47, 2012.

VERTENTEN, G.; DECLERCO, J.; GASTHUYS, F.; DEVISSCHER, L.; TORFS, S.; VAN LOON, G.; MARTENS, A. Abomasal end-to-end anastomosis as treatment for abomasal fistulation and herniation in a cow. *Veterinary Record*, v. 164, n. 1, p. 785-786, 2009.

# Modelos didáticos para compreensão do desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos

## Teaching kit for understanding the embryonic early development of domestic animals

### Resumo

Neste trabalho é apresentada uma estratégia didática destinada a possibilitar uma melhor compreensão dos eventos embrionários iniciais do desenvolvimento de animais domésticos, para alunos de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brasil. Para tanto, foram confeccionados modelos em biscuit que apresentam aspectos morfológicos do desenvolvimento inicial, como a célula fertilizada, clivagem inicial, formação de blastocisto e dos folhetos embrionários, desenvolvimento da cavidade amniótica, do celoma extraembrionário e do cório. O kit de modelos apresenta como inovação características morfológicas diferentes dos modelos amplamente comercializados e utilizados para ensinar embriologia humana, uma vez que inclui peculiaridades observadas apenas em animais domésticos, como o alongamento do blastocisto e a formação de pregas amnióticas para o desenvolvimento da cavidade amniótica. O kit desenvolvido e aplicado em aula prática foi aceito pelos alunos de graduação de Medicina Veterinária como elemento favorável ao aprendizado de embriologia.

### Summary

This paper presents a didactic strategy to contribute to the better understanding of the early embryonic events in the development of domestic animals. It was developed and applied to the Veterinary Medicine undergraduate program in the Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil. Therefore, clay models were made presenting morphological aspects of the early embryo development, such as the fertilized cell, early cleavage, blastocyst and germ layers formation, amniotic cavity, extraembryonic coelom and corium development. The kit is an innovation because it presents different characteristics when compared to the models widely marketed and used for teaching human embryology, as it demonstrates peculiarities observed only in domestic animals, such as the blastocyst elongation process, the formation of amniotic folds for the development of the amniotic cavity formation. The developed kit was applied in class and was accepted by veterinary medicine undergraduates as a favorable element of learning early embryology.

Recebido em 27 de novembro de 2014 e aprovado em 5 de janeiro de 2015

Ludimila Canuto Faccioni <sup>1</sup>

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências  
Biológicas e da Saúde – CCBS. Setor de Biologia Geral.  
CEP 79070-900 – Campo Grande-MS – Brasil



#### Palavras-chave

Kit didático. Desenvolvimento embrionário. Animais domésticos. Ensino de graduação. Modelo em biscuit.

#### Keywords

Teaching model. Embryonic development. Domestic animals. Undergraduate education. Clay models.

**N**a disciplina de embriologia veterinária é necessário que o aluno assimile os processos morfológicos regidos pelo desenvolvimento embrionário. Nesse contexto, os processos devem ser analisados passo a passo, e o fenômeno de que células morfologicamente iguais proliferam a partir de uma célula inicial e migram para locais específicos, caracterizando primórdios teciduais com futuro pré-estabelecido, deve ser incorporado pelo aluno como um evento complexamente regulado no espaço e no tempo.

Para facilitar o aprendizado de embriologia, muitos modelos representativos do desenvolvimento inicial humano (FREITAS et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; SILVEIRA; IDERIHA, 2013) e *e-book* (PEREIRA et al., 2014) têm sido confeccionados, comercializados e utilizados, tanto no ensino médio como recurso didático em cursos de graduação nas áreas de saúde e biologia. Em animais domésticos, como bovinos, equinos, caprinos e suínos, o desenvolvimento embrionário apresenta algumas peculiaridades que não são observadas em seres humanos (HYTTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Dessa forma, o aluno de medicina veterinária, até a realização deste trabalho, não tinha contato com recursos didáticos adequados para a compreensão dos aspectos iniciais do desenvolvimento embrionário dos animais.

Uma das peculiaridades de embriões de animais domésticos é que o blastocisto sofre um processo de alongamento (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; HALL et al., 2013) e o embrião torna-se filamentososo; o que não ocorre no ser humano (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012). A região da trofotoderma que reveste ou cobre o embrioblasto é degenerada e o embrioblasto passa a ficar exposto. Em função desse processo, a formação da cavidade amniótica ocorre de maneira distinta da observada em humanos (NODEN; LAHUNTA, 1990; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

A cavidade amniótica é formada pela projeção de pregas de origem da trofotoderma associada ao mesoderma extraembrionário, ou do cório, que se lançam acima do embrioblasto, mais precisamente sobre o ectoderma embrionário. Com a fusão dessas pregas haverá a proteção do embrioblasto por uma cavidade preenchida por líquido amniótico (NODEN; LAHUNTA, 1990; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Em humanos, a cavidade amniótica se dá pelo processo de cavitação no epiblasto (GARCIA; FERNANDEZ, 2012; MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2012).

Dadas as diferenças entre o desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos e humanos, o objetivo do presente trabalho foi criar modelos didáticos coerentes e compatíveis com o ensino de embriologia veterinária e aplicá-los no processo de ensino, a fim de avaliar a sua contribuição como estratégia destinada à potencialização do aprendizado dos alunos do Curso de Medicina Veterinária.

### Materiais e métodos

Método de confecção dos modelos: Anteriormente à confecção dos modelos, foi necessária a leitura de capítulos de livros de embriologia veterinária, artigos de revisão, bem como o estudo de imagens ilustrativas (NODEN; LAHUNTA, 1990; SADLER, 2006; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; HALL et al., 2013). Foram utilizadas para a confecção dos modelos massa de biscuit incolor industrial e tinta de tecido. As diferentes cores usadas representaram distintos destinos estruturais. Estruturas em marrom representaram os blastômeros iniciais e o trofotoderma; estruturas em azul representaram o epiblasto e o ectoderma; estruturas em amarelo representaram o hipoblasto e o saco vitelino; enquanto as estruturas em verde representaram o endoderma embrionário e início da formação do alantóide. As estruturas rosa representaram o mesoderma intraembrionário e extraembrionário. Foram desenvolvidas as clivagens iniciais e a formação da mórula. Para esses

estágios, foram utilizadas bolas de isopor de cinco centímetros de diâmetro revestidas pelo biscuit corado em marrom. Foram confeccionados os modelos de blastocisto, seguidos dos processos de delaminação do disco, degeneração do trofotoderma acima do embrioblasto, alongamento do blastocisto, formação do saco vitelino, processo de gastrulação com formação de linha primitiva e o desenvolvimento das pregas amnióticas. Um dos modelos propicia a explicação da formação de esplancopleura e somatopleura. No total, dez modelos foram confeccionados.

Métodos de aplicação do kit didático: Inicialmente, após aula teórica sobre clivagem, formação de mórula, blastocisto e processo de gastrulação em animais domésticos, os alunos do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul tiveram aula prática convencional em laboratório de microscopia. Nessa aula, foram utilizadas lâminas com o desenvolvimento inicial de ouriço de mar para observação do padrão de clivagem, e lâminas com montagem total de embrião de galinha com 18 horas de desenvolvimento, para consolidação dos conceitos de gastrulação por meio de observação da linha primitiva. Foi solicitado que alguns alunos explicassem o processo de gastrulação e de formação da cavidade amniótica em animais domésticos.

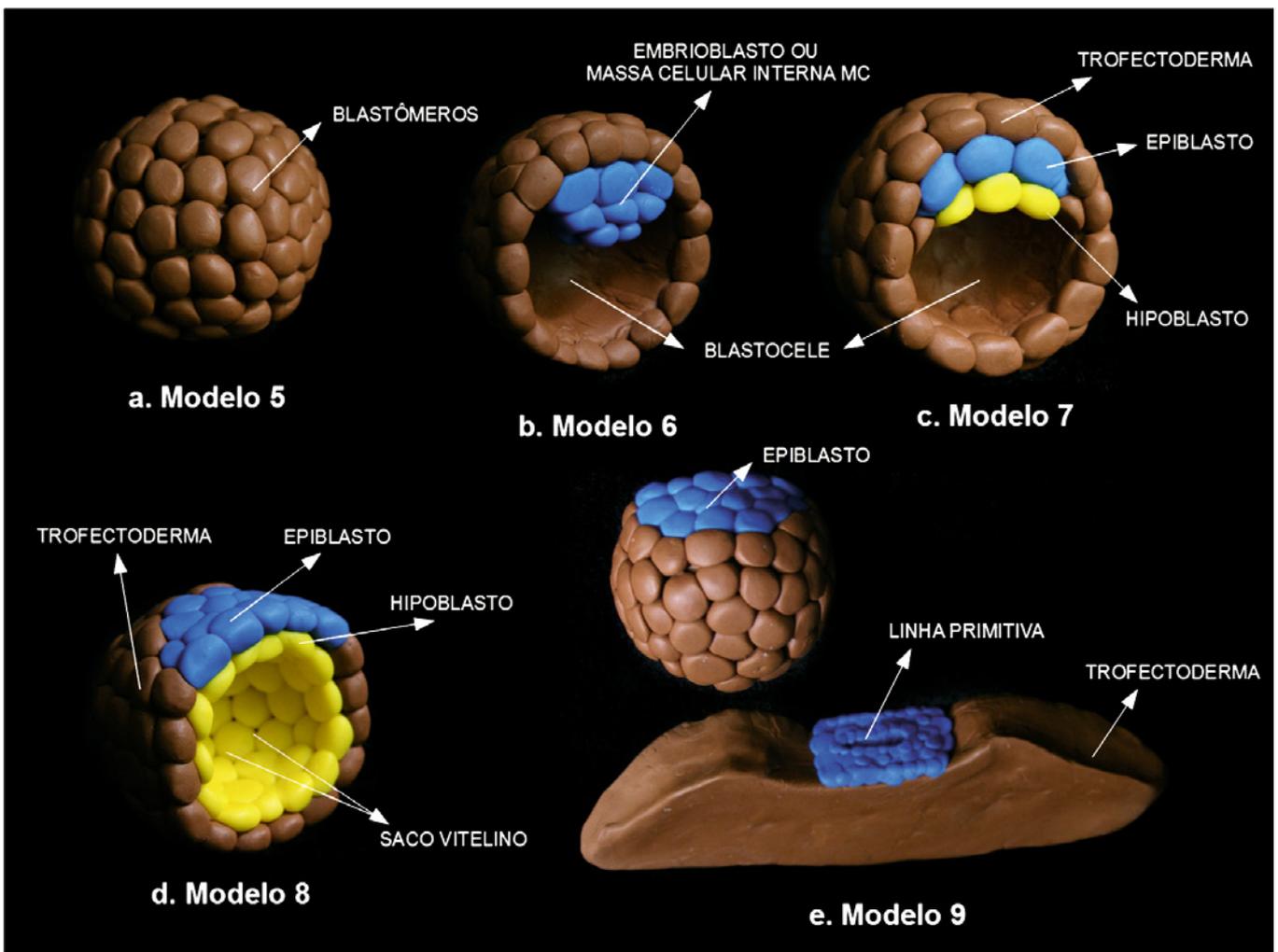
Na semana seguinte, uma explicação foi realizada junto à demonstração dos modelos confeccionados em biscuit e, nesse processo, foram apontados todos os aspectos morfológicos envolvidos no desenvolvimento inicial dos animais domésticos. Os alunos puderam tocar as peças, questioná-las e fotografá-las para estudos posteriores. Em seguida, foi solicitado a alguns alunos que novamente explicassem o processo de gastrulação e formação da cavidade amniótica em animais domésticos.

### Resultados

Dez modelos em massa de biscuit foram desenvolvidos como produto da modelagem artesanal. A figura 1 representa os processos de clivagens iniciais por meio de quatro modelos: a célula ovo fertilizada (Fig. 1 – modelo 1), dois blastômeros resultantes da primeira clivagem (Fig. 1 – modelo 2), quatro blastômeros resultantes da segunda clivagem (Fig. 1 – modelo 3) e oito blastômeros resultantes da terceira clivagem (Fig. 1 – modelo 4). A figura 2 representa, por meio de cinco modelos: a mórula (Fig. 2 – modelo 5); o blastocisto (Fig. 2 – modelo 6); os aspectos morfológicos do disco bilaminar, o hipoblasto e o epiblasto (Fig. 2 – modelo 7); o processo de degeneração do trofotoderma acima do epiblasto (Fig. 2 – modelo 8); e o processo de alongamento do blastocisto a partir do blastocisto esférico (Fig. 2 – modelo 9).



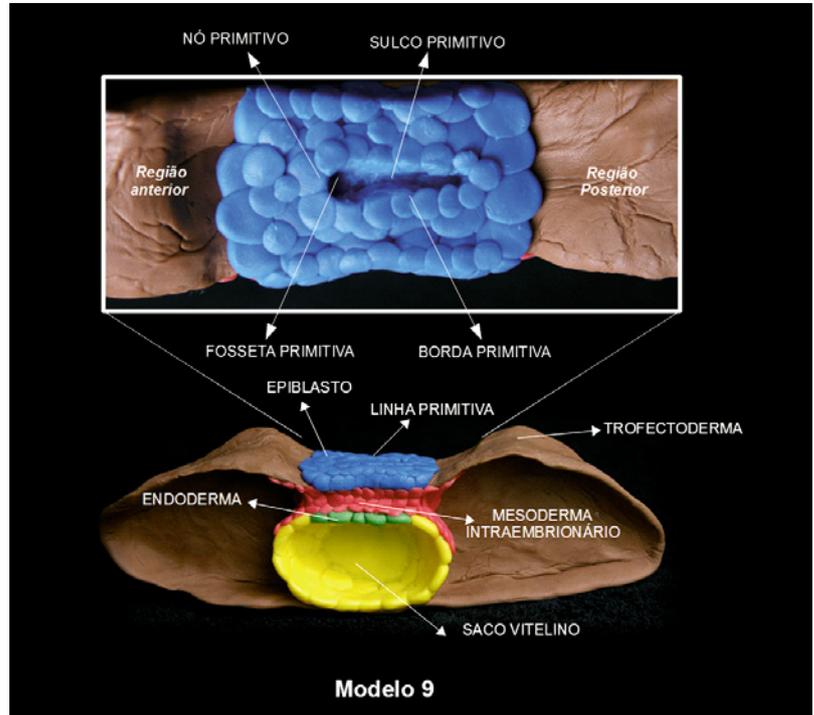
**Figura 1** – Processos iniciais de clivagem  
Foto: Lima, Danilo Falleiros (2014)  
Modelo: Faccioni, Ludimila Canuto (2014)



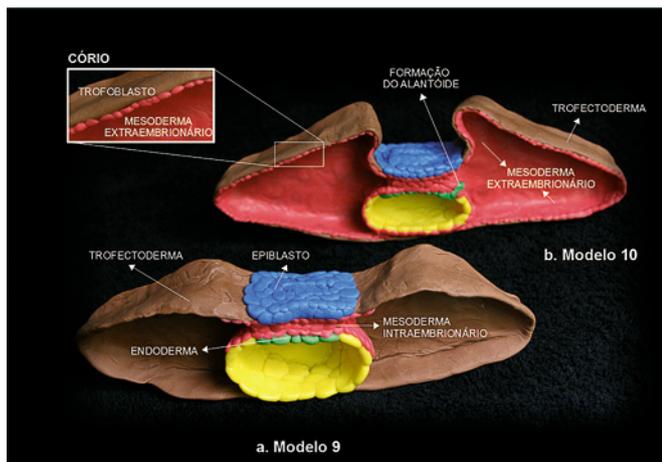
**Figura 2** – Mórula (a), Interior do Blastocisto (b), Blastocisto com disco bilaminar (c), Degeneração do trofocotoderma acima do epiblasto (d) e Alongamento do blastocisto (e)  
Foto: Lima, Danilo Falleiros (2014)  
Modelo: Faccioni, Ludimila Canuto (2014)

A figura 3 enfatiza a formação da linha primitiva como resultado da migração celular do epiblasto para entre epiblasto e hipoblasto, demonstrando o sulco e bordas primitivas, além da fosseta e do nó primitivo. É destacado o processo de formação dos três folhetos embrionários: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma originados do disco bilaminar, mais precisamente do epiblasto. Além disso, também é realçado o embrião em seu estado filamentososo.

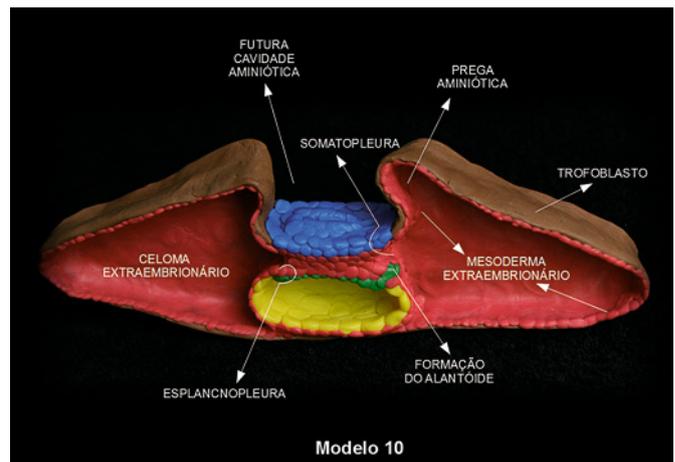
A figura 4 mostra a formação do mesoderma extraembrionário revestindo internamente o trofotoderma (Fig. 4 – modelo 9) e originando o celoma extraembrionário (Fig. 4 – modelo 10). Simultaneamente, percebe-se a formação do cório e a evolução das pregas amnióticas (Fig. 4 – modelo 10). A figura 5 ressalta a formação da somatopleura e do esplancnopleura e o início da formação do alantoide (Fig. 5).



**Figura 3 – Linha primitiva e gastrulação**  
Foto: Lima, Danilo Falleiros (2014)  
Modelo: Faccioni, Ludimila Canuto (2014)



**Figura 4 – Formação de celoma extraembrionário, do cório e das pregas amnióticas**  
Foto: Lima, Danilo Falleiros (2014)  
Modelo: Faccioni, Ludimila Canuto (2014)



**Figura 5 – Somatopleura e esplancnopleura**  
Foto: Lima, Danilo Falleiros (2014)  
Modelo: Faccioni, Ludimila Canuto (2014)

Os alunos ficaram motivados com os modelos apresentados. Esse comportamento foi observado, dada a sua maior participação durante a manipulação dos modelos. Muitas perguntas surgiram e puderam ser respondidas com a utilização do kit didático. Ao final, foi solicitado que alguns alunos explicassem as etapas do desenvolvimento, enfatizando as peculiaridades observadas nos animais domésticos.

A explicação dada pelos alunos com a utilização dos modelos foi clara e objetiva. Além disso, os alunos

revelaram maior compreensão dos processos envolvidos em comparação com a sistemática anteriormente empregada, na qual os modelos não foram utilizados como apoio didático.

Os alunos relataram que a utilização dos modelos antes das aulas práticas, cujo material de apoio foram as lâminas de ouriço do mar e de embrião de galinha com 18 horas, poderia ter elucidado melhor os aspectos do desenvolvimento inicial e que muitos deles não tinham, até então, entendido a correlação dos processos explicados

em aula teórica com a utilização das lâminas, em especial a lâmina de embrião de 18 horas de desenvolvimento. Com a utilização dos modelos apresentados, os processos de clivagem, gastrulação, formação de celoma extraembrionário bem como a formação da cavidade amniótica foram melhor compreendidos pelos alunos de graduação em embriologia veterinária.

### Considerações finais

A utilização do kit didático contribuiu para a melhor compreensão do desenvolvimento embrionário inicial de animais domésticos pelos alunos, facilitando a consolidação de conceitos de embriologia. O material foi aceito pelos alunos de medicina veterinária, uma vez que o uso de laminário, por si só, não oferece o aspecto tridimensional do desenvolvimento embrionário inicial. Além disso, o material usado comumente em aula prática não retrata os processos de alongamento do blastocisto e da formação da cavidade amniótica, aspectos distintos dos observados em aves e humanos. Ressalta-se que os modelos produzidos contribuíram significativamente para a aprendizagem dos acadêmicos e refletiram na íntegra as estruturas morfológicas representadas.

## Referências

- FREITAS, L. A. M.; BARROSO, H. F. D.; RODRIGUES G.; AVERSI-FERREIRA, T. A. Construction of embryonic models with recycled material for didactic using. *Bioscience Journal*, v. 24, p. 91-97, 2008.
- GARCIA, S. M. L.; FERNANDEZ, C. G. *Embriologia*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 651 p.
- GILBERT, S. F. *Biologia do desenvolvimento*. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003. 994 p.
- HALL, V.; HINRICHS, K.; LAZZARI, G.; BETTS, D. H.; HYTTTEL, P. Early embryonic development, assisted reproductive technologies, and pluripotent stem cell biology in domestic mammals. *The Veterinary Journal*, v. 197, p. 128-142, 2013.
- HYTTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. *Embriologia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 455 p.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N.; TORCHIA, M. G. *Embriologia básica*. 8.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 348p.
- NODEN, D. M.; LAHUNTA, A. de. *Embriología de los animales domésticos*. Zaragoza: Editorial Acribia, 1990. 422 p.
- OLIVEIRA, M. S.; KERBAUY, M. N.; FERREIRA, C. N. M.; SCHIAVÃO, L. J. V.; ANDRADE, R. F. A.; SPADELLA, M. A. Use of teaching material about nervous system embryology: a students' evaluation. *Revista Brasileira de Educação Médica*, v. 36, p. 83-92, 2012.
- PEREIRA, L. A. V.; JUSTINO, M. L.; MORAES, S. G. *Embriologia humana integrada: animações e casos clínicos* [recurso eletrônico]. Campinas: CEDET, 2014. Disponível em: <<http://www.embriologiahumana.com.br>>.
- PURVES, W. K.; SADAVA, D. E.; ORIAN, G. H.; HELLER, H. C. *Life: The science of biology*. 6. ed. Massachusetts: Sinauer e Freeman, 2001. 945 p.
- SADLER, T. W. *Langman's medical embryology*. 10. ed. Baltimore: Lippincott Williams and Wilkins, 2006. 424 p.
- SILVEIRA, S. R.; IDERIHA, N. M. Uso de modelo tridimensional de argila no ensino-aprendizagem de embriologia humana. *Mirabilia Medicinae*, v. 1, n. 2, 2013. Trabalho apresentado ao 1º Seminário UNESC de Humanidades Médicas, 2013.

# Reconhecimento materno da gestação em animais de produção

## Maternal recognition of pregnancy in livestock animals

### Resumo

O reconhecimento materno da gestação é o período em que o concepto sinaliza a sua presença para a mãe. Esse é um importante momento da gestação, que pode ser decisivo para o progresso da prenhez. Durante a gestação, ocorre uma série de eventos hormonais, envolvendo progesterona e prostaglandinas, sendo fundamental a função do corpo lúteo, uma glândula temporária formada a partir da ovulação de um folículo. O corpo lúteo produz a progesterona, esteroide envolvido tanto na ciclicidade ovariana quanto no estabelecimento e manutenção da gestação, na maioria dos mamíferos. Algumas particularidades dos eventos envolvidos na relação materno-fetal durante o reconhecimento da gestação em espécies domésticas foram abordadas nesta revisão; entre estas, foi descrito o papel fundamental da proteína interferon-tau (INF-T) com ação antiluteolítica comprovada e que está associada ao reconhecimento materno da gestação em ruminantes; a movimentação do embrião equino, mantendo a sua sinalização; os estrogênios produzidos pelos conceptos suínos com função luteotrófica para a espécie, mas que também possui função luteolítica em outras espécies.

### Summary

The maternal recognition of pregnancy is the period when the conceptus signals its presence to the mother. This is an important moment of pregnancy, which can be decisive for the progress of pregnancy. During gestation, there is a series of events involving progesterone and prostaglandins produced by corpus luteum, a temporary gland formed from a single ovulation follicle. The progesterone produced by corpus luteum is a steroid involved in both ovarian cyclicity and the establishment and maintenance of pregnancy in most mammals. Some peculiarities of the events involved in the maternal-fetal relationship during pregnancy recognition among domestic species have been discussed in this review, one of them is the key role of interferon-tau protein (INF-T) protein that has proven antiluteolytic function and that is associated with maternal recognition of pregnancy in ruminants; the movement of the equine embryo in order to maintain its signaling; the estrogens produced by the pig fetuses, which have luteotrophic function for this species, but also has luteolytic function in others species.

Recebido em 30 de junho de 2014 e aprovado em 15 de agosto de 2014

Márcio Aparecido Pereira<sup>1</sup>

Rennan Lopes Olio<sup>1</sup>

Amilton Cesar dos Santos<sup>1</sup>

Diego Carvalho Viana<sup>1</sup>

Phelipe Oliveira Favaron<sup>1</sup>

Maria Angélica Miglino<sup>1</sup>

✉ marciopereira.vet@gmail.com



**Palavras-chave**

Ciclicidade ovariana.  
Corpo lúteo. Progesterona.

**Keywords**

Ovarian ciclicity.  
Corpus luteum. Progesterone.

O reconhecimento materno da gestação pode ser definido como o período em que o conceito sinaliza sua presença para a mãe (ANTONIAZZI et al., 2011). A sinalização acontece em vários momentos no decorrer da gestação, sendo vital em algumas espécies a intervenção do embrião para a manutenção do corpo lúteo (CL), mediante a atenuação da secreção luteolítica, prostaglandina F2 alfa (PGF2 $\alpha$ ) (ROBERTS; XIE; MATHIALAGAN, 1996). Para que a gestação tenha o desenvolvimento esperado, é necessário que se mantenha o corpo lúteo, estabelecido após a ovulação (ROBERTS et al., 2008).

Stephen (1985) define como “período crítico” do reconhecimento materno da gestação um curto intervalo de 24-48 h durante o início da gestação de espécies domésticas, quando o organismo materno reage ao embrião presente dentro do útero. Após a fecundação, se os embriões por alguma razão não se mantiverem viáveis no útero entre o 13º e 16º dia a contar do primeiro dia do estro em algumas espécies domésticas (suínos, bovinos e ovinos), há uma regressão do corpo lúteo (CL) e o ciclo estral subsequente ocorre normalmente, no tempo esperado para cada espécie. No entanto, se os embriões se mantiverem nesse período, o CL persiste por cinco a seis dias além do seu período de vida normal. Essas observações conduziram à noção de que o conceito de alguma maneira protege o CL da luteólise durante o reconhecimento materno da gestação (NORTHEY; FRENCH, 1980; BALL; DAY, 1982).

<sup>1</sup> Pós-graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, SP, Brasil (FMVZ/USP). Avenida Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-270, São Paulo – SP, Brasil.

O corpo lúteo pode ser descrito como uma glândula temporária, formada a partir da ovulação de um folículo, e a progesterona, a sua principal secreção, é um esteroide necessário tanto para a ciclicidade ovariana quanto para o estabelecimento e manutenção da gestação na maioria dos mamíferos (McCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; NISWENDER et al., 2000; DAVIS; RUEDA, 2002). A progesterona induz a diferenciação do estroma uterino, estimula as secreções das glândulas endometriais, o acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular e modifica o padrão de secreção de proteínas pelas células endometriais. Essas proteínas proporcionam o ambiente uterino apropriado para o desenvolvimento inicial do embrião (BAZER et al., 1986; NISWENDER, 2002).

Em alguns animais domésticos, a progesterona pode ser requerida para que a gestação chegue a termo. Ela age no útero, estimulando e mantendo a secreção de substâncias necessárias à nutrição adequada dos embriões e permitindo o adequado desenvolvimento placentário e fetal, de modo a possibilitar o sucesso da gestação (KERBLER et al., 1997; SPENCER et al., 2004). Algumas particularidades dos eventos envolvidos na relação materno-fetal durante o reconhecimento da gestação em espécies domésticas são abordadas nesta revisão. Entre estas, é descrito o papel fundamental da proteína interferon-tau ( $INF_{-T}$ ) que possui ação antiluteolítica e que está associada ao reconhecimento materno da gestação em ruminantes.

## Desenvolvimento

Desde a fecundação, para que a prenhez se estabeleça e a gestação chegue a termo, o organismo desencadeia uma série de eventos, entre os quais o reconhecimento materno da gestação assume um papel fundamental, pois qualquer deficiência nesse período compromete a implantação e o posterior desenvolvimento do concepto. Nessa etapa, a manutenção da função do corpo lúteo é um fator primordial.

## Ruminantes

O período de pré-implantação, compreendido entre a fecundação do oócito e a implantação do concepto, é caracterizado por clivagens sucessivas do zigoto e estádios embrionários iniciais bem como por eventos morfo-genéticos de compactação e cavitação, que culminam com a formação do blastocisto (WATSON; NATALE; BARCROFT, 2004). Durante esse período, ocorrem complexas interações entre o ovário, o endométrio e o embrião, necessárias para que a gestação se estabeleça e o concepto permaneça viável (GOFF, 2002).

A maior causa de falha reprodutiva em ruminantes é a

mortalidade do zigoto e do embrião em estágio inicial de desenvolvimento; o que contribui negativamente para o número de nascidos, interferindo no avanço genético dos rebanhos e causando perdas econômicas significativas. O processo de fecundação geralmente gera índices de 90,0% contra as perdas embrionárias, que se encontram na faixa de 29,0% a 39,0%, e cuja maioria ocorre entre os dias oito e 16 pós-inseminação ou cobertura (DUNNE; DISKIN; SREENAN, 2000).

As perdas embrionárias na fase inicial da gestação podem ocorrer devido a problemas inerentes ao próprio embrião ou ao ambiente uterino. Entretanto, acredita-se que boa parte da mortalidade embrionária esteja relacionada à ocorrência de problemas de sinalização concepto-maternal (SPENCER et al., 2004). Em virtude de uma sinalização deficiente, o desenvolvimento do embrião pode ficar comprometido, ou mesmo retardar o seu crescimento, e ainda pode haver falhas na produção de concentrações fisiológicas de interferon-tau ( $INF_{-T}$ ), ou na síntese de hormônios e fatores de crescimento de origem embrionária ou uterina, interferindo negativamente sobre o desenvolvimento e a sobrevivência do concepto (RILEY; MOLEY, 2006).

No início da década de 80, foi purificada uma proteína secretada pelo concepto ovino que expressava características antiluteolíticas. Essa proteína, inicialmente chamada de proteína X e posteriormente denominada trofoblastina ovina (TP-1), foi o principal produto de conceptos ovinos em cultura, entre os dias 10 e 12 de gestação (GODKIN et al., 1982). Em experimentos subsequentes, essa proteína foi sequenciada e renomeada como proteína interferon-tau ( $INF_{-T}$ ), tendo a sua função antiluteolítica comprovada e associada ao reconhecimento materno da gestação em ruminantes (IMAKAWA et al., 1987; ROBERTS et al., 1989; ROBERTS; CROSS; LEAMAN, 1992).

Nos ruminantes a fase de reconhecimento materno ocorre entre o 12º e o 26º dia quando ocorre a secreção da proteína interferon-tau ( $INF_{-T}$ ), com pico entre os dias 15 e 16 (FARIN; IMAKAWA; ROBERTS, 1989; ROBERTS, 1991). Como resposta, o  $INF_{-T}$  inibe a transcrição de receptores de estrógenos e ocitocina no endométrio inibindo a luteólise. (SPENCER; BAZER, 1996; CHEN et al., 2006). Nesta fase há o alongamento do embrião, que coincide com a máxima produção de IFNT (ZARCO et al., 1988).

O  $INF_{-T}$  é classificado como interferon do tipo I, secretado em grandes quantidades pelas células trofoblásticas dos ruminantes antes da implantação. A sua principal função é evitar o retorno à ciclicidade, preservando o funcionamento do corpo lúteo durante a gestação (FARIN; IMAKAWA; ROBERTS, 1989; GUILLOMOT et al., 1990; GRAY et al., 2002; ROBERTS et al., 2008). O  $INF_{-T}$

produzido pelo concepto tem um efeito parácrino no útero, inibindo a expressão dos receptores de estrógeno e de ocitocina no epitélio luminal do endométrio, evitando assim a liberação de PGF2  $\alpha$ , hormônio responsável pela luteólise (SPENCER; BAZER, 1996). O INF- $\tau$  também tem o papel de estimular a produção de prostaglandina E2, (um agente luteotrófico), e de aumentar a produção de diversas proteínas secretórias de origem uterina, que podem estar envolvidas na manutenção da viabilidade do concepto. Essa expressão de INF- $\tau$  termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio inibe a sua produção (NAGAOKA et al., 2003).

Um dos efeitos da proteína interferon-tau (INF- $\tau$ ) pode ser a redistribuição de prostaglandina F (PGF), produzida pelo útero de modo que PGF e prostaglandina E (PGE) acumulam-se no lúmen uterino, inibindo assim sua ação luteolítica. Há evidências de que nos ruminantes os níveis venosos útero-ovarianos de PGF2 $\alpha$  são reduzidos durante o início da prenhez, embora a capacidade do útero de produzir PGF permaneça inalterada (FINDLAY et al., 1981).

## Equinos

Desde a fecundação até o início do desenvolvimento embrionário no oviduto, os embriões entram no útero, iniciando-se a fase de blastocisto, independentemente da espécie. Em éguas, os óvulos não fertilizados nunca entram no útero, permanecendo assim no oviduto até uma possível fecundação (WEBER et al., 1991). Os eventos ocorridos durante a fase da pré-implantação são importantes, pois antecedem o reconhecimento materno, implantação e placentação necessária para o crescimento placentário-fetal bem como para o desenvolvimento normal da gestação (BAZER et al., 2009). Apesar das diferenças na duração do período de pré-implantação e do tipo de placentação (invasiva e não invasiva), os estágios gerais são os mesmos, comuns entre as diferentes espécies animais. (SPENCER et al., 2007).

Os mecanismos de sinalização materna da gestação podem ser tanto de origem luteotrófica, ou seja, uma ação hormonal diretamente sobre o corpo lúteo para manter a sua integridade estrutural e funcional, como acontece, por exemplo, nos primatas e roedores (FAZLEABAS; KIM; STRAKOVA, 2004; SOARES, 2004), ou antiluteolítica, ou seja, uma manobra para inibir a liberação de prostaglandina que provoca a luteólise, como ocorre em ruminantes e suínos (BAZER et al., 2008). Particularmente nos equinos, quando o embrião se mover continuamente ao longo do corno uterino, há a supressão da liberação cíclica normal da prostaglandina F2 $\alpha$  pelo endométrio, que resulta na manutenção funcional do corpo lúteo (SPENCER et al., 2007; FAZLEABAS; KIM; STRAKOVA, 2004).

Bazer et al. (2008) observaram que o concepto equino pode inibir a produção de prostaglandina (PGF) pelo endométrio uterino. A PGF é um hormônio com ação luteolítica e durante o ciclo estral das éguas há um aumento das suas concentrações no sangue venoso uterino e no útero, entre os dias 14° e 16° do estro, quando ocorre a luteólise, e, conseqüentemente, há um declínio dos níveis de progesterona no plasma. A concentração de PGF captada por receptores do corpo lúteo é máxima no 14° dia do ciclo estral e 18° dia de gestação (BAZER, 1992). O corpo lúteo das éguas pode responder à PGF em circulação durante a gravidez, mas cabe ao embrião utilizar os mecanismos antiluteolíticos. Em éguas prenhes, há pouca PGF nos fluidos uterinos; no sangue venoso uterino ela é reduzida; e no sangue periférico não há um padrão de liberação episódica, sendo que, na presença do concepto, a produção de PGF endometrial é reduzida. Em resposta à estimulação do colo do útero, há ocitocina exógena, indicando a ausência ou redução dos receptores de ocitocina endometrial durante o início da prenhez (SHARP et al., 1989).

Durante o desenvolvimento do concepto equino dentro do lúmen uterino, pode se observar por ultrassonografia que o embrião se movimenta frequentemente antes que ocorra a fixação mesometrial. Paralelamente, há mudanças dramáticas na forma do embrião entre os dias 11 a 21, variando entre as formas, esféricas, oblongada, triangular e irregular (GINTHER, 1983).

O embrião equino na sua forma esférica (contido dentro de uma cápsula) pode migrar entre os cornos uterinos 12-15 vezes por dia, a fim de interagir com o endométrio uterino antes da sua fixação que ocorre por volta do 18° dia de gestação. Esse processo parece ser um mecanismo necessário para a inibição da produção da PGF endometrial, de modo a proteger o corpo lúteo da luteólise (HAYES et al., 2008). Entre os dias 8 e 20 da gestação, o embrião equino também produz quantidades crescentes de estradiol, e alguns experimentos com éguas tratadas com estrogênio na tentativa de prolongar a vida útil do corpo lúteo têm se mostrado inconsistentes (SHARP et al., 1989).

## Suínos

O tempo médio de gestação dos suínos é de 114 dias, sendo que na fase inicial da gestação, de 0 a 21 dias, ocorre a fecundação, aposição do embrião, reconhecimento da gestação e o início da formação da placenta (BOYD; GONZALO; CABRERA, 2002). Nessa fase o embrião depende de secreções uterinas para sua sobrevivência e desenvolvimento (CARVALHO et al., 2003), e, após o 30° dia, a placenta se encontra completamente formada, mas ainda continua crescendo até o 70° dia

da gestação, assemelhando-se com o embrião em relação ao peso. O reconhecimento materno propriamente dito ocorre entre os dias 11 e 12 de gestação, quando o blastocisto, com aproximadamente 10 mm de diâmetro e apresentando uma forma ovoide, continua a dividir-se pelo processo de hiperplasia, expande-se, de forma variada entre os embriões, dando origem a uma estrutura tubular de até 100 mm de comprimento (GEISERT et al., 1982; STROBAND; VAN DER LEND, 1990). Essa variação, semelhante ao que ocorre durante a ovulação e fecundação, resulta em embriões com diferentes estágios de desenvolvimento, associando isso ao alongamento dos embriões. Nesse período, há um aumento na síntese de estrógeno pelo blastocisto e a quantidade de estrógeno vai variar de acordo com o estágio de desenvolvimento e com o número de embriões presentes em ambos os cornos uterinos; já que são necessários pelo menos quatro embriões para que haja o sinal de reconhecimento da gestação e a gestação prossiga (DHINDSA; DZIUK, 1968).

Embora o início da gestação dos suínos seja semelhante ao que ocorre em outras espécies, no que diz respeito à necessidade de secreção da progesterona para a manutenção da gravidez, parece haver diferenças entre espécies e nos mecanismos pelos quais a função lútea é mantida. Nos suínos, como em outras espécies, o blastocisto produz substâncias que retardam a regressão luteal quando entram no útero. Entretanto, os estrogênios produzidos pelos conceptos suínos reconhecidos como luteotróficos para a espécie são luteolíticos para outras, como ocorre, por exemplo, na ovelha (FLINT et al., 1983).

A administração sistêmica de valerato estradiol na dose de 5mg /dia prolonga a função lútea em até 100 dias, e reduz a secreção de PGF2  $\alpha$  no útero dos suínos. Essa ação pode resultar em uma reorientação da PGF uterina. Um efeito semelhante parece ocorrer no início da gravidez. Uma vez que o embrião ganha a habilidade de produzir estrogênios entre os dias 10 e 12 de gestação, os níveis do estrogênio venoso útero-ovariano são elevados, em comparação com porcas não grávidas nos dias 1-17. Esse mecanismo oferece um meio pelo qual o concepto pode exercer uma ação luteotrófica no período do reconhecimento materno da prenhez (FLINT et al., 1983).

No período de 10 a 12 dias da gestação, a síntese do estrógeno de origem embrionária irá promover uma mudança na direção de secreção da PGF2 $\alpha$  de endócrina para exócrina (lúmen uterino), inibindo, assim, a luteólise, o que irá diferir entre o ciclo reprodutivo normal e a gestação nos suínos (GADSBY; HEAP; BURTON, 1980; KRZYMOWSKI; KOTWICA; STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, 1990).

## Referências

- ANTONIAZZI A. Q.; LUIZ, E. H.; JOÃO, F. C. O.; THOMAS, R. H. The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. *Ciência Rural*, v. 41, n. 1, p. 176-185, 2011.
- BALL, G. D.; DAY, B. N. Bilateral luteal maintenance in unilaterally pregnant pigs with infusions of embryonic extracts. *Journal of Animal Science*, v. 5, n. 4, p. 142-149, 1982.
- BAZER, F. W.; VALLET, J. L.; ROBERTS, R. M.; SHARP, D. C.; THATCHER, W. W. Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction and Infertility*, v. 76, n. 2, p. 841-850, 1986.
- BAZER, F. W. Mediators of Maternal Recognition of Pregnancy in Mammals. *Experimental Biology and Medicine (Maywood)*, v. 199, p. 373-384, 1992.
- BAZER, F. W., BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; SPENCER, T. E.; WU, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathways. *Reproductive Biology*, v. 8, p. 179-211, 2008.
- BAZER, F. W.; SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A. Interferons and uterine receptivity. *Seminars in Reproductive Medicine*, v. 27, p. 90-102, 2009.
- BAZER, F. W.; THOMAS, E. S.; GREG, A. J.; ROBERT, C. B.; GUOYAO, W. Comparative aspects of implantation. *Reproduction*, v. 138, p. 195-209, 2009.
- BOYD, R. D.; GONZALO, C. C.; CABRERA, R. A. Nutrition and management of the sow to maximize lifetime productivity. *Advances in Pork Production*, v. 13, p. 47-59, 2002.
- CARVALHO, L. F. R.; SILVA FILHO, J. M.; SILVA, I. J.; BANDEIRA, M. N.; MORAIS, M. P.; RUAS, J. R. M. Efeito da aplicação de hCG sobre a concentração sérica de progesterona e eficiência reprodutiva em porcas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 6, p. 7, 2003.
- CHEN, Y.; GREEN, J. A.; ANTONIOU, E.; EALY, A. D.; MATHIALAGAN, N.; WALKER, A. M.; AVALLE, M. P.; ROSENFELD, C. S.; HEARNE, L. B.; ROBERTS, R. M. Effect of interferon-tau administration on endometrium of nonpregnant ewes: a comparison with pregnant ewes. *Endocrinology*, v. 147, n. 5, p. 2127-2137, 2006.
- DAVIS, J. S.; RUEDA, B. R. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Frontiers in Bioscience*, v. 7, p. 1949-1978, 2002.
- DHINDSA, D. S.; DZIUK, P. J. Effect on pregnancy in the pig after killing embryos or fetuses in one uterine horn early in gestation. *Journal Animal Science*, v. 27, p. 122-126, 1968.
- DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 39-44, 2000.
- FARIN, C. E.; IMAKAWA, K.; ROBERTS, R. M. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. *Molecular Endocrinology*, v. 3, n. 7, p. 1099-1107, 1989.
- FAZLEABAS, A. T.; KIM, J. J.; STRAKOVA, Z. Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment – a review. *Placenta*, v. 25, p. 26-31, 2004.
- FINDLAY, J. K.; ACKLAND, N.; BURTON, R. D.; DAVIS, A. J.; WALKER, F. M.; WALTERS, D. E.; HEAP, R. B. Protein, prostaglandin and steroid synthesis in caruncular and intercaruncular endometrium of sheep before implantation. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 62, p. 361-377, 1981.
- FLINT, A. P. F.; BURTON, R. D.; GADSBY, J. E.; HEAP, R. B.; SHEDDRIC, E. L. Embryonic steroid synthesis and luteal oxytocin production: controlling mechanisms for the maternal recognition of pregnancy. *Journal of Steroid Biochemistry*, v. 19, n. 1, p. 973-978, 1983.

- GADSBY, J. E.; HEAP, R. B.; BURTON, R. D. Oestrogen production by blastocyst and early embryonic tissue of various species. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 60, p. 409-417, 1980.
- GINTHER, O. J. Fixation and orientation of the early equine conceptus. **Theriogenology**, v. 19, n. 4, p. 07-14, 1983.
- GEISERT, R. D.; RENEGAR, R. H.; THATCHER, W. W.; ROBERTS, R. M.; BAZER, F. W. Establishment of pregnancy in the pig: I. Interrelationships between preimplantation development of the pig blastocyst and uterine endometrial secretions. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 925-939, 1982.
- GODKIN, J. I.; BAZER, F. W.; MOFIATT, J.; SESSIONS, F.; ROBERTS, R. M. Purification and properties of a major low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at Day 13-21. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 65, p. 141-150, 1982.
- GOFF, A. K. Embryonic signals and survival. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 133-139, 2002.
- GRAY, C. A.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; SPENCER, T. E. Evidence that absence of endometrial gland secretions in uterine gland knockout ewes compromises conceptus survival and elongation. **Reproduction**, v. 124, n. 2, p. 289-300, 2002.
- GUILLOMOT, M.; MICHEL, C.; GAYE, P.; CHARLIER, N.; TROJAN, J.; MARTAL, J. Cellular localization of an embryonic interferon, ovine trophoblastin and its mRNA in sheep embryos during early pregnancy. **Biology of the Cell**, v. 68, n. 3, p. 205-211, 1990.
- HAYES, M. A.; QUINN, B. A.; KEIRSTEAD, N. D.; KATAVOLOS, P.; WAELCHLI, R. O.; BETTERIDGE, K. J. Proteins associated with the early intrauterine equine conceptus. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 232-237, 2008.
- IMAKAWA, K.; ANTHONY, R. V.; KAZEMI, M.; MAROTTL, K. R.; POLITE, H. G.; ROBERTS, R. M. Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophoblast. **Nature**, v. 330, n. 6146, p. 377-379, 1987.
- KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 3, p. 703-714, 1997.
- KRZYMOWSKI, T.; KOTWICA, J.; STEFANCZYK-KRZYMOWSKA, S. Uterine and ovarian countercurrent pathways in the control of ovarian function in the pig. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 179-191, 1990.
- MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263-323, 1999.
- NAGAOKA, K.; SAKAI, A.; NOJIMA, H.; SUDA, Y.; YOKOMIZO, Y.; IMAKAWA, K. A chemokine, interferon (IFN)-gamma-inducible protein 10 kDa, is stimulated by IFN-tau and recruits immune cells in the ovine endometrium. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1413-1421, 2003.
- NISWENDER, G. D.; JUENGLER, J. L.; SILVA, P. J.; ROLLYSON, M. K.; MCINTUSH, E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1-29, 2000.
- NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339, 2002.
- NORTHEY, D. L.; FRENCH, L. R. Effect of embryo removal and intrauterine infusion of embryonic homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum. **Journal of Animal Science**, v. 5, n. 1, p. 298-302, 1980.
- RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, p. 823-835, 2006.
- ROBERTS, R. M.; IMAKAWA, K.; NIWANO, Y.; KAZEMI, M.; MALATHY, P. V.; HANSEN, T. R.; GLASS, A. A.; KRONENBERG, L. H. Interferon production by the pre implantation sheep embryo. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 9, n. 2, p. 175-187, 1989.
- ROBERTS, R. M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 2, p. 294-302, 1996.
- ROBERTS, R. M.; CHEN, Y.; EZASHI, T.; WALKER, A. M. Interferons and the maternal-conceptus dialog in mammals. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 19, n. 2, p. 170-177, 2008.
- SHARP, D. C.; McDOWELL, K. J.; WEITHENAUER, J.; FRANKLIN, K.; MIRANDO, M.; BAZER, F. W. Is an interferon-like protein involved in the maternal recognition of pregnancy in mares? **Equine Veterinary Journal**, v. 21, n. S8, p. 7-9, 1989.
- SOARES, M. J. The prolactin and growth hormone families: pregnancy specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 51, 2004.
- SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 1144-1147, 1996.
- SPENCER, T. E.; BURGHARDT, R. C.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 537-550, 2004.
- SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BAZER, F. W.; BURGHARDT, R. C. Fetal-maternal interactions during the establishment of pregnancy in ruminants. **Society of Reproduction and Fertility**, v. 64, p. 379-396, 2007.
- STEPHEN, P. F. Maternal recognition of pregnancy in the ewe, cow and sow: vascular and immunological aspects. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 145-159, 1985.
- STROBAND, H. W. J.; VAN DER LENDE, T. Embryonic and uterine development during early pregnancy in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 40, p. 261-277, 1990.
- WATSON, A. J.; NATALE, D. R.; BARCROFT, L. C. Molecular regulation of blastocyst formation. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 583-592, 2004.
- WEBER, J. A.; FREEMAN, D. A.; VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 540-543, 1991.
- ZARCO, L.; STABENFELDT, G. H.; BASU, S.; BRADFORD, G. E.; KINDAHL, H. Modification of prostaglandin F-2 alpha synthesis and release in the ewe during the initial establishment of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 527-536, 1988.



# XXIII SEMANA DO VPT

## XXIII SEMANA DO VPT

## XXIII SEMANA CIENTIFICA PROF. DR. BENJAMIN EURICO MALUCELLI

8 a 10 de outubro de 2014

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

São Paulo (SP) – Brasil

IDENTIFICAÇÃO DE STEC (*ESCHERICHIA COLI* PRODUTORA DE TOXINA SHIGA) EM PSITACÍDEOS CRIADOS COMO PETS: POTENCIAL ZONÓTICO E RISCO PARA A SAÚDE PÚBLICAGIOIA-DI CHIACCHIO, R.M.<sup>1</sup>; PEREIRA, P.C.B.<sup>2</sup>; MARTINS, F.H.<sup>2</sup>; CUNHA, M.P.V.<sup>1</sup>; FRANZOLIN, M.R.<sup>2</sup>; PIAZZA, R.M.F.<sup>2</sup>; KNÖBL, T.<sup>1</sup><sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil;<sup>2</sup>Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** Dentre os psitacídeos criados como pets, destacam-se as calopsitas (*Nymphicus hollandicus*) e periquitos-australianos (*Melopsittacus undulatus*), por serem dóceis, companheiros e possuírem plumagem colorida exuberante. Embora os benefícios decorrentes da presença dessas aves em ambiente doméstico seja reconhecido, pouco se conhece sobre os riscos de transmissão de zoonoses. A emergência e reemergência de zoonoses obrigam-nos a reavaliar conceitos e expectativas. *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família Enterobacteriaceae, sendo o micro-organismo mais estudado em todo o mundo. É isolado em diversos sítios do corpo humano e animal, causando diarreias, infecções urinárias, pulmonares, neurológicas, entre outras. Alguns sorotipos de *E. coli* são considerados diarreio gênicos e as técnicas moleculares são úteis na identificação dos componentes genéticos de virulência. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença de STEC (*E. coli* diarreio gênica produtora de toxina Shiga) em fezes de calopsitas e periquitos-australianos.

**Material e métodos:** 126 amostras de fezes de aves domiciliadas na cidade de São Paulo foram colhidas com o auxílio de suabes estéreis, sendo 67 de calopsitas e 59 de periquitos-australianos. O material foi transportado para o laboratório sob refrigeração, submetido à cultura bacteriológica, seguida da identificação pela morfologia e série bioquímica. Após a extração de DNA, foi realizada a pesquisa dos genes *eae*, *stx1* e *stx2* pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foram identificadas 83 colônias de *Escherichia coli*. Destas, 8/83 (9,6%) foram classificadas como STEC, positivas para o gene *eae* e *stx2*, sendo três isoladas de calopsitas (3/48) e cinco de periquitos (5/35). **Resultado:** Os resultados revelaram uma frequência de ocorrência de 6,3% de STEC em aves pets, com percentual de 4,47% em calopsitas e 8,47% em periquitos. Amostras que apresentam o perfil genotípico *stx2* + *eae* são comumente associadas a quadros severos de infecção humana, como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica. A despeito dos bovinos serem o reservatório natural de linhagens que produzem a toxina *stx2*, esta já foi descrita em aves comerciais. STEC representa risco potencial para a saúde humana. Devido à crescente procura de psitacídeos como animais de estimação, principalmente por crianças e adolescentes, são necessários novos estudos sobre os riscos zoonóticos relacionados às aves de estimação.

**Conclusão:** A técnica de PCR foi um instrumento importante para a detecção dos genes *eae* e *stx2*, demonstrando que os psitacídeos são potenciais fontes de infecção de STEC. **Apoio Financeiro:** CAPES.

## AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES AMBIENTAIS EM BIOTÉRIOS DE EXPERIMENTAÇÃO DA USP

PINHO, E. A. S.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, E. S.<sup>1</sup>; SOUZA, N. L.<sup>2</sup><sup>1</sup>Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP – Ribeirão Preto; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) – São Paulo.

**Introdução e Objetivos:** Modelos animais para a pesquisa estão predominantemente vinculados a biotérios de IES públicas da região sudeste do Brasil. Ainda há incorreções ambientais que implicam no comprometimento da saúde animal e, conseqüentemente, das pesquisas com eles desenvolvidas. Por não haver dados concretos sobre biotérios brasileiros, no presente trabalho foram investigadas as condições ambientais de biotérios de experimentação da USP, de modo a serem obtidas informações destinadas a nortear melhorias para a saúde e o bem estar animal. **Material e Métodos:** Um questionário foi distribuído a 21 biotérios cadastrados na Pró-Reitoria de Pesquisa da USP e a participação ocorreu mediante um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, com compromisso de sigilo absoluto. Os resultados foram obtidos das respostas fornecidas por dez biotérios de experimentação. **Resultados e Discussão:** Os biotérios analisados (E1 a E10) alojam mais de uma espécie, todas de padrão sanitário convencional (CV), havendo camundongos em 80% dos casos, ratos (100%), cobaias (20%), coelhos (30%) e hamsters (30%). A área destinada aos animais em relação à área total do biotério varia de 20% a 100%, sendo que os E2, E3, E5, E6, E7, E8 e E10 (70%) apresentam boa distribuição física com 41,43% a 11,36% da área total para os animais, e o restante ocupado por corredores e áreas de apoio. Apenas E4 apresenta área total para alojamento e desinfecção deficiente, devido ao fato de ter essa área imiscuída à dos animais e utilizar somente detergente neutro. Os E1, E4 e E9 citaram salas de animais em contato com área de circulação externa, o que possibilita maior presença de contaminantes. Os biotérios E1, E3, E5, E7, E8 e E10 também utilizam racks, os quais promovem ventilação intracage (ICV), com conseqüente melhoria nas condições atmosféricas microambientais e na saúde dos animais. Estantes ventiladas, que se caracterizam por promover ventilação geral diluidora mais eficiente (VGD+), foram citadas pelos E1, E2, E5, E7 e E10, enquanto que gaiolas comuns (VGD) são utilizadas em 70% dos biotérios analisados. A troca de gaiolas ocorre a cada 2, 3 ou 4 dias, e apenas o biotério E10 adota duas trocas de gaiolas/semana concomitantemente com a desinfecção adequada com NaClO, esterilização da cama e materiais, além de condições atmosféricas adequadas (17 trocas de ar/h, temperatura de 22 a 25°C e umidade relativa do ar entre 45 a 75%). **Conclusões:** 1. Necessidade de ampliação dos E1, E4 e E9 para criação de corredores e áreas de apoio; 2. Deve-se promover e homogeneizar a individualização das espécies, otimizando o espaço com racks ou estantes ventiladas; 3. Mesmo sendo de padrão sanitário CV, o E10 apresenta condições ambientais mais adequadas em termos de sanidade e bem estar de animais em biotérios de experimentação.

### DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES DE *COPAIFERA RETICULATA*, DUCKE ENRIQUECIDAS EM BIOMOLÉCULAS ANTINEOPLÁSICAS (PROJETO)

DOMINGUES, P. S.; FUKUMASU, H.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução:** Durante as últimas décadas o câncer de pulmão em humanos tornou-se uma das principais causas de morte por todo o mundo, com maior frequência do que outros cânceres. Mesmo com os avanços científicos das terapias para a doença, há a necessidade de se encontrar novas formas de tratamento e prevenção. Como alternativa, existem substâncias quimiopreventivas do câncer. Uma fonte de grande interesse para a obtenção desses compostos é atribuída às plantas. O óleo de copaíba extraído da espécie *Copaifera reticulata*, Ducke apresenta, assim como óleos de outras espécies de copaíferas, várias indicações medicinais. Estudos atribuem ao óleo atividade anti-inflamatória e antitumoral. Desse modo, foi efetuado o seu fracionamento para avaliação das suas biomoléculas com estudo do efeito citotóxico e pró-apoptótico em cultivo de células humanas não cancerosas (HPL) e células cancerosas de pulmão humano (H460 e H2023). **Métodos:** As amostras do óleo serão fracionadas por cromatografia em camada delgada. Depois, cada fração será analisada e identificada por espectrometria de massas. O teste de viabilidade celular utilizará o corante Azul de Tripan e a contagem será realizada em câmara de Neubauer. Cada tipo de célula terá o seu comportamento avaliado após o tratamento nas placas de 96 poços para cada fração do óleo de copaíba. A avaliação da citotoxicidade da fração do bálsamo que melhor apresentar resultados será efetuada por um ensaio colorimétrico utilizando o MTT reagent (Thyazolyl Blue Tetrazolium Bromide) para calcular a dose que inibirá 50% das células (IC<sub>50</sub>). A análise do ciclo celular será realizada por citometria de fluxo para resultados em % de células nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S ou G<sub>2</sub>/M. A taxa de células em apoptose será avaliada pelo método de quantificação de apoptose pela técnica de fluorescência com Laranja de Acrídina e Brometo de Etídio. **Resultados Esperados:** Esperamos identificar e avaliar as biomoléculas antineoplásicas do óleo em linhagens de células de câncer de pulmão humano, uma vez que a determinação de novos compostos é essencial para o desenvolvimento de drogas na corrida por novas alternativas no tratamento e na intervenção terapêutica do paciente oncológico. Os resultados serão dispostos como média e desvio padrão, analisados estatisticamente por testes não paramétricos, dependendo dos grupos em questão, considerando-se  $p < 0,05$ . **Conclusão:** Em razão da necessidade do desenvolvimento de novas drogas contra o câncer, o desenvolvimento deste trabalho agregará dados que poderão contribuir para a identificação de novas terapias antineoplásias. Este estudo também poderá contribuir para ressaltar e valorizar a necessidade da certificação científica dos produtos fitoterápicos existentes e provenientes da flora amazônica brasileira.

### ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE PULMÕES DE COBAIAS (*CAVIA PORCELLUS*) MANTIDAS EM SISTEMA DE VENTILAÇÃO MICROAMBIENTAL SOB DIFERENTES REGIMES DE TROCA DE AR POR HORA

RODRIGUES, R.; CARISSIMI, A. S.

Departamento de Medicina Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

**Introdução:** Nos últimos anos, é cada vez maior o emprego de sistemas de ventilação forçada (ventilação microambiental - VMA) para a manutenção de espécies de animais de laboratório, visando proporcionar um ambiente mais controlado e adequado no interior das gaiolas dos animais. A despeito do uso e desempenho desses sistemas de VMA estarem sendo investigados, ainda se conhece pouco em relação às velocidades de ar e trocas de ar adequadas para cada espécie animal. Dessa forma, o presente trabalho avaliou a incidência de lesões no pulmão de cobaias (*Cavia porcellus*) mantidas em diferentes regimes de troca de ar por hora (ACH). **Métodos:** Dezoito cobaias, fêmeas jovens, com peso médio de 250g, colônia Duncan-Hartley, foram divididas em três grupos e alojadas em gaiolas com três animais cada em um protótipo de ventilação microambiental dotado de ajuste mecânico de vazão de ar. Os grupos foram alojados em condições de troca de ar por hora, como segue: grupo controle com regime de 15 trocas de ar por hora, grupo experimental I, com regime de 40 trocas de ar por hora e grupo experimental II, com regime de 80 trocas de ar por hora. Os animais foram mantidos durante 90 dias nas condições descritas e submetidos à rotina de manejo no Biotério Central da UFRGS. Ao término do período de alojamento, os animais foram eutanasiados com pentobarbital (via intraperitoneal, 150 mg/kg) e, a seguir, foi efetuada a coleta de fragmento pulmonar (pulmão direito, lobo médio). O processamento do material foi realizado conforme técnicas de rotina histológica com avaliação por microscopia ótica, após coloração por Hematoxilina-eosina. **Resultado:** A análise histopatológica evidenciou maior número e intensidade de lesões nos animais pertencentes ao grupo experimental II (com 80 ACH), no qual foi observada a presença de hiperplasia de tecido linfóide peribronquiolar e focos de pneumonia purulenta multifocal, além de áreas de enfisema, o que não foi notado nos grupos controle e experimental I (com 40 ACH), nos quais foram observadas congestão e algumas células gigantes nos alvéolos, com sugestiva vantagem para o grupo experimental II. **Conclusão:** Os resultados obtidos sugerem que o regime mais adequado de trocas de ar por hora no interior das gaiolas das cobaias seja de 40 trocas de ar por hora, e que um regime com mais trocas de ar por hora é deletério para os animais. **Apoio Financeiro:** Pró-Reitoria de Pesquisa – UFRGS.

### DETECÇÃO DE FUNGOS EM NEOPLASIAS E SUA POSSÍVEL RELAÇÃO COM A MALIGNIDADE (PROJETO EM ANDAMENTO)

RANIERI, T.<sup>1</sup>; ROCHETTI, A.<sup>2</sup>; FUKUMASU, H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA-USP).

**Introdução:** Os estudos com células neoplásicas demonstram que estas são fenotipicamente distintas entre si, apresentando diferentes características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, podendo ainda exibir características individualizadas quanto ao desenvolvimento e comportamento. A compreensão das interações entre as células e os diferentes compostos da matriz extracelular tornou-se essencial para a caracterização da complexidade do desenvolvimento

neoplásico e das suas possíveis respostas aos diferentes tratamentos antineoplásicos disponíveis. Estudos anteriores demonstraram que pode haver desenvolvimento de fungos em amostras de tecido neoplásico de diferentes órgãos isolados em excisões cirúrgicas. Fungemias são reconhecidas recorrentes em pacientes oncológicos humanos imunossuprimidos. Muitos casos são negligenciados por acreditar-se que a imunossupressão é a causa da fungemia letal. Portanto, neste experimento pretende-se avaliar qualitativamente a presença de fungos em cortes histológicos de neoplasias mamárias de cadelas e analisar sua possível associação com o grau de malignidade. **Materiais e métodos:** O experimento retrospectivo inicial visa analisar 100 amostras de neoplasias mamárias caninas por histopatologia e microscopia de fluorescência com a utilização de Hematoxilina/Eosina (HE), Hidróxido de Potássio (KOH) a 10% com Calcofluor White e possivelmente outras colorações para detecção direta de fungos que serão realizadas em cortes seriados. **Resultados Preliminares:** Foi padronizada a colorização Calcofluor White para detecção de fungos em cortes histológicos conservados em parafina e também para aplicação em cultivos celulares. A melhor diluição obtida de KOH 10% e Calcofluor White foi de 2:1, respectivamente. Cortes histológicos foram desparafinizados e, após a passagem pelo álcool 70% e uma breve secagem, 150µl de KOH 10% foram adicionados, cobrindo o corte. Após um minuto, 75µl de Calcofluor White foram colocados sobre o KOH 10%, permanecendo por mais um minuto. O esgotamento da lâmina não deve ser realizado usando papel. Cobriu-se com lâmina e observou-se ao microscópio U.V. Foram realizadas fotomicrografias. O experimento piloto contou também com ensaios em células de cultivo, nos quais a quantidade de KOH 10% em cada poço foi 100µl e de Calcofluor White, 50µl. O processo foi realizado na própria placa de cultivo. Após o tempo indicado, retirou-se a lâmina com cuidado e essa foi colocada com a face invertida na lâmina para observação e registro. Iniciaremos a seguir a coloração e análise das primeiras 25 amostras de neoplasias mamárias caninas. Devido à difícil detecção direta de fungos em tecidos, é possível que o segmento desse experimento seja o cultivo. **Apoio Financeiro:** CNPq

### MODULAÇÃO DA COMUNICAÇÃO INTERCELULAR VIA JUNÇÕES DO TIPO GAP NAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS EM MODELOS 3D DA DOENÇA HEPÁTICA GORDUROSA NÃO ALCOÓLICA (PROJETO)

ARAÚJO, C. M. M.<sup>1</sup>; SILVA, T. C.<sup>1</sup>; VINKEN, M.<sup>2</sup>; COGLIATI, B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), Brasil; <sup>2</sup> Faculty of Medicine and Pharmacy, Vrije Universiteit Brussel, Bélgica.

**Introdução:** a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) está relacionada à obesidade e pode evoluir de esteatose para esteatohepatite (ENA), fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A esteatose é considerada como um importante fator de risco na progressão da fibrose, principalmente pela secreção de citocinas e fatores de crescimento pelos hepatócitos gordurosos. A liberação parácrina dessas substâncias favorece a ativação e proliferação das células estreladas (CEHs), principais células envolvidas na fibrogênese hepática. Diversas drogas e tratamentos experimentais vêm sendo desenvolvidos para modular a atividade funcional das CHEs, sendo a comunicação intercelular via junções GAP um importante alvo terapêutico. A comunicação intercelular das células estreladas é realizada via junções do tipo GAP, mediadas pela conexina 43 (Cx43), possibilitando o livre trânsito de pequenas moléculas, metabólitos e mensageiros secundários, com papel importante na regulação da função e homeostasia celular. No entanto, os

mecanismos celulares e moleculares associados à inibição desses canais e redução da expressão de Cx43 nas CHEs ainda não são conhecidos. Modelos *in vitro* que utilizam o cocultivo de hepatócitos e CEHs podem simular alguns aspectos fisiopatogênicos da DHGNA, reduzindo o uso de animais de experimentação nos testes pré-clínicos e acelerando o processo de descoberta de novas moléculas. O modelo de cocultivo 3D em esferoides foi recentemente padronizado pelo grupo e mimetiza o microambiente encontrado no fígado, permitindo a interação de diferentes células e seus subprodutos. **Objetivos:** avaliar a participação da comunicação intercelular via junções do tipo GAP na funcionalidade das CHEs e, conseqüentemente, sua potencialidade como alvo terapêutico em um modelo 3D da DHGNA. **Métodos:** o modelo 3D será obtido pelo cocultivo de linhagens de hepatócitos C3A e CHEs LX2 humanas (48h, MEM 10% SFB). Os grupos analisados compõem esferoides formados com hepatócitos normais ou induzidos à esteatose pela incubação com ácidos graxos livres. As CHEs serão tratadas com siRNA para Cx43 ou inibidores farmacológicos das junções GAP (carbenoxolona e Gap27), antes da formação dos esferoides. Esses cocultivos 3D serão submetidos à avaliação funcional da comunicação intercelular, para garantir a efetividade da inibição das junções GAP, sendo depois avaliados por citometria de fluxo para análise do ciclo celular, proliferação e apoptose. Adicionalmente, serão avaliadas as conexinas 43, 26 e 32 pelas técnicas de imunofluorescência, western blot e PCR em tempo real. **Apoio Financeiro:** CAPES.

### DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE NEOPLASIA MALIGNA DE CÉLULAS REDONDAS INTESTINAL EM CÃO (CANIS LUPUS FAMILIARIS)

GOMES, R. G.; LACERDA, A. M. D.; SILVA, E. C.; RODRIGUES, D. M.; DAGLI, M. L. Z.; TORRES, L. N.

Serviço de Patologia Animal, Hospital Veterinário (HOVET), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução:** O sistema gastrointestinal de cães pode ser acometido por neoplasias malignas de várias origens, como adencarcinomas, tumores estromais e de células redondas. Dentre as neoplasias intestinais originadas de células redondas, o linfoma é a mais comum. **Relato de Caso:** um cão macho de cinco anos de idade da raça Shar-Pei foi atendido na Clínica Cirúrgica do HOVET-FMVZ/USP, com histórico de êmese e diarreia há seis meses, com piora há um mês. O exame ultrassonográfico revelou espessamento de parede segmentar de alça intestinal com perda da estratificação, contornos irregulares, ecogenicidade diminuída e linfonodos mediastinais com dimensões aumentadas. Foi efetuada a enterectomia parcial, e o segmento acometido e um fragmento de linfonodo mesentérico foram encaminhados para realização de exame histopatológico. Ao exame macroscópico do segmento, foi observado um aumento de volume com superfície lisa nodular, aspecto heterogêneo, coloração esbranquiçada e consistência firme. À microscopia, foi observada uma ulceração com infiltração neoplásica transmural de células redondas com pleomorfismo celular e moderado infiltrado de eosinófilos intratumorais. O fragmento de linfonodo revelou infiltração neoplásica semelhante à da alça, com marcante infiltrado eosinofílico. O diagnóstico morfológico foi compatível com neoplasia maligna de células redondas pouco diferenciada. O exame imunoistoquímico pelos marcadores C-kit, CD79 A e CD3 apresentou resultados negativos para C-kit e CD79 A, e positivo para CD3. A morfologia e a imunofenotipagem caracterizaram a neoplasia como linfoma intestinal de células T. **Discussão:** A forma mais comum dos linfomas em cães é a multicêntrica e a forma intestinal primária é a menos frequente (5% a 7%).

Os linfomas intestinais primários de cães se originam frequentemente de células T. Morfologicamente, a apresentação do linfoma intestinal de célula T é semelhante à de mastocitoma pouco diferenciado, pelas características celulares (células redondas com citoplasma moderado e altamente pleomórficas), por não serem observados grânulos intracitoplasmáticos na hematoxilina-eosina e pela presença de infiltrado eosinofílico. A coloração por Azul de Toluidina pode revelar poucas células com metacromasia citoplasmática, o que dificulta mais o diagnóstico diferencial. Desse modo, um painel imunistoquímico faz-se necessário para a caracterização da neoplasia. **Conclusão:** o presente relato evidencia a importância da realização de painel imunistoquímico para a diferenciação de neoplasias pouco diferenciadas, como entre linfoma intestinal de células T e mastocitoma intestinal.

### IMUNIDADE HUMORAL ESPECÍFICA EM CÃES DE ÁREA ENDÊMICA DE ACORDO COM O ESTADIAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

BATISTA L. F.<sup>1,2</sup>; SILVA, T. B. F.<sup>2</sup>; ANDRADE, R. D.<sup>2</sup>; TOMOKANE, T. Y.<sup>2</sup>; PACHECO, A. D.<sup>3</sup>; MARCONDES, M.<sup>3</sup>; LAURENTI, M. D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Laboratório de Patologia de Moléstias Infeciosas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil; <sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**Introdução e Objetivos:** apesar do número considerável de relatos sobre os aspectos da imunidade humoral da leishmaniose canina, com especial referência para a classe e subclasse de imunoglobulinas, nenhum deles relaciona os resultados obtidos com o estadiamento da infecção. A maioria dos estudos já realizados avaliou a produção de anticorpos apenas em duas ou três categorias clínicas (cães assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos). O presente trabalho avaliou os níveis de imunoglobulinas IgA, IgE, IgG e IgM em soro de cães de área endêmica para leishmaniose visceral canina (LVC) e verificou as suas relações com o estadiamento clínico, enfatizando seu potencial como biomarcadores de progressão da infecção. **Material e Métodos:** sessenta e seis cães foram agrupados, de acordo com sinais clínicos e diagnóstico, em: grupo I – controle negativo, cães oriundos de área não endêmica, com PCR negativa (n=11); grupo II – cães expostos, oriundos de área endêmica, com PCR negativa e baixos títulos de IgG específica (n=12); grupo III – cães infectados, oriundos de área endêmica, com PCR positiva e aparentemente sadios (n=13); grupo IV – cães doentes, oriundos de área endêmica, com PCR positiva e apresentando sinais externos da LVC (n=19); grupo V – cães severamente doentes, oriundos de área endêmica, com PCR positiva e apresentando pelo menos um dos sinais sugestivos de envolvimento sistêmico (n=11). **Resultados:** a IgA específica foi detectada em 34,5% e IgE em 38,2% dos cães de área endêmica, especialmente em cães severamente doentes (grupo V). Por outro lado, IgG e IgM específicas foram detectadas na maioria dos cães de área endêmica, 89% e 100%, respectivamente: desde os cães expostos (grupo II) até os cães severamente doentes (grupo V). A medida em que a LVC tornou-se mais severa os níveis de IgA, IgE e IgG aumentaram e os de IgM diminuíram. **Conclusão:** Os resultados sugerem que IgA, IgE, IgG e IgM poderiam ser usadas como biomarcadores de progressão da LVC. **Apoio Financeiro:** FAPESP 2012/50285-9 e 2012/05847-9, CNPq, LIM50-HCFMUSP.

### MENINGIOMA TRANSICIONAL SUPRATENTORIAL EM CÃO (CANIS LUPUS FAMILIARIS)

GUGLIELMI, R. M. de A. C.<sup>1</sup>; LACERDA, A. M. D.<sup>2</sup>; SILVA, E. C.<sup>2</sup>; GOMES, R. G.<sup>2</sup>; RODRIGUES, D. M.<sup>2</sup>; TORRES, L. N.<sup>2</sup>; PINTO, F. C.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, Hospital Veterinário (HOVET), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil.

**Introdução:** As neoplasias intracranianas são classificadas, de acordo com a origem, em primárias ou secundárias e, de acordo com sua localização, em supratentorial ou infratentorial. Entre as neoplasias supratentoriais, a mais comumente relatada em cães é o meningioma, sendo a crise convulsiva a principal manifestação clínica. **Relato de Caso:** Um canino, fêmea, SRD, de dez anos de idade, foi encaminhado ao setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do HOVET-FMVZ/USP com histórico de convulsão generalizada desde os nove anos de idade, sem alterações em período interictal. Os exames clínico e neurológico apresentavam-se dentro dos parâmetros de normalidade. Passado um mês, o animal retornou com histórico de andar compulsivo, *head pressing* e vocalização havia três dias, evoluindo desfavoravelmente para coma, paresia palpebral, ausência de reflexo óculo-cefálico e parada respiratória, optando-se pela eutanásia. O animal foi conduzido ao Serviço de Patologia do HOVET-FMVZ/USP para realização de exame necroscópico que revelou intensa congestão meníngea, edema, discreta herniação cerebral transtentorial, além de uma neoformação expansiva, bem delimitada, esbranquiçada a acinzentada, de consistência friável medindo aproximadamente 4 x 3 x 3 cm, em região de núcleo caudado/putâmen/tálamo direito que ultrapassada os bordos dos lobos frontais até o limite da lâmina cribiforme. A análise microscópica caracterizou uma neoplasia altamente celular, de caráter predominantemente expansivo comprimindo o neurópilo e ventrículos laterais adjacentes: composta por células poligonais a fusiformes, de citoplasma moderado, bordos indistintos, com arranjo em feixes multidirecionais com formação de abundantes ninhos/redemoinhos concêntricos. A neoformação foi histologicamente compatível com meningioma transicional. **Discussão:** cães com neoplasias intracranianas localizadas em região rostral de cérebro podem apresentar inicialmente um exame clínico e neurológico normal, sendo a crise convulsiva a única manifestação evidente. O meningioma é comumente relatado em região supratentorial e pode ser classificado histologicamente em benigno (possuindo diferentes padrões, tais como meningotelial, fibroso, transicional, psamomatoso, entre outros), ou maligno (anaplásico). Geralmente são nodulares bem definidos, firmes e cinza-esbranquiçados. O meningioma transicional é caracterizado pela formação de ninhos e redemoinhos celulares. **Conclusão:** deve-se suspeitar de neoplasias intracranianas supratentoriais em cães com histórico de convulsão tardia (sete anos ou mais), mesmo em animais com exame neurológico normal. Entre elas, o meningioma benigno apresenta maior prevalência, o exame histopatológico é necessário para o estabelecimento do diagnóstico e do tipo de padrão morfológico presente.

## ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS PRELIMINARES SUGESTIVOS DE MIOPATIA POR CAPTURA EM TECIDOS SELECIONADOS DE CETÁCEOS ENCALHADOS NO NORDESTE BRASILEIRO

SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.<sup>1\*</sup>; FORERO-RAMÍREZ, C. J.<sup>2</sup>; COSTA-SILVA, S.<sup>1</sup>; SACRISTÁN, C.<sup>1</sup>; REISFELD, L.<sup>1</sup>; SGUARIO, S. P.<sup>1</sup>; CARVALHO, V. L.<sup>3</sup>; GROCH, K. R.<sup>1</sup>; CATÃO-DIAS, J. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), SP, Brasil; <sup>2</sup>Universidad de la Salle, Bogotá, Colômbia; <sup>3</sup>Associação de Pesquisa e Preservação de Ecossistemas Aquáticos (AQUASIS), Caucaia, Ceará, Brasil.

**Introdução e Objetivos:** os encalhes de cetáceos são eventos importantes, freqüentes, e podem estar associados a diversas causas, como agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias, protozoários e parasitas, além de causas congênitas e traumáticas. De maneira geral, a maioria das espécies de cetáceos é afetada pelo estresse durante a sua manipulação, situação que pode se agravar durante um encalhe quando grande parte dos espécimes morre após poucos dias ou horas. É sabido que o estresse é um estímulo adaptativo frente a mudanças ambientais, determinando adaptações metabólicas positivas para a proteção orgânica contra agressões externas. Em situações em que o estresse é prolongado ou muito intenso, a grande liberação de catecolaminas e/ou hipóxia subjacente pode resultar em danos nocivos aos tecidos, em especial músculos cardíaco e estriado. Essa situação pode levar a um processo patológico similar, a miopatia de captura (MC), síndrome de caráter metabólico muscular que acomete principalmente animais selvagens, evento mais descrita em aves e cervídeos. Esse processo encontra-se associado a altos níveis de estresse pós-captura, ou durante manejo e transporte. O presente trabalho avaliou as lesões compatíveis com MC em amostras de cetáceos depositados no Banco de Tecidos de Mamíferos Marinhos do Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo, Brasil (BTMM/LAPCOM/VPT/FMVZ/USP). **Material e Métodos:** Foram analisados sob microscopia de luz os tecidos cardíaco, musculoesquelético e renal de seis cetáceos (quatro *Kogia sima* e dois *Peponocephala electra*), que encalharam vivos no nordeste brasileiro, provenientes da instituição AQUASIS (Caucaia, CE, Brasil). **Resultados e Discussão:** a lesão miocárdica mais frequente foi a vacuolização perinuclear (6/6), seguida de necrose em bandas de contração (4/6), e rabdomiólise (2/6). Em músculo esquelético, a rabdomiólise foi observada em maior proporção (3/4) e a degeneração discoide e necrose segmentar foram observadas em 50% dos tecidos examinados (2/4). No rim, a necrose tubular aguda não foi encontrada em nenhuma das amostras analisadas (0/6). **Conclusão:** As lesões observadas neste trabalho foram compatíveis com as previamente descritas para a síndrome de MC em mamíferos marinhos e são consistentes com o histórico dos animais. Ainda, ressalta-se que os resultados são preliminares: dessa forma, o presente trabalho será ampliado com a realização da investigação imunohistoquímica para mioglobina e fibrinogênio. **Apoio Financeiro:** FAPESP e CAPES.

## ESTUDO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA CUTÂNEA EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) – PROJETO

RUOPPOLO, V.<sup>1,2</sup>; RIBEIRO, J. D.<sup>3,4</sup>; VANSTREELS, R. E. T.<sup>1,2</sup>; HURTADO, R.<sup>2</sup>; PEDRON, B.<sup>5</sup>; CORTOPASSI, S. R. G.<sup>5</sup>; CATÃO-DIAS, J. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), Departamento de Patologia (VPT), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Aiuká Consultoria em Soluções Ambientais, Praia Grande, SP; <sup>3</sup>Sabina Parque Escola do Conhecimento, Prefeitura de Santo André, SP; <sup>4</sup>Departamento de Reprodução Animal (VRA), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>5</sup>Departamento de Clínica Cirúrgica Veterinária (VCI), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução:** a escassez de conhecimento acerca do sistema imune de pinguins tem limitado avanços no diagnóstico e tratamento de enfermidades infecciosas observadas em tais animais durante a sua manutenção em centros de reabilitação ou zoológicos. A prova de inoculação de fitohemaglutinina (FHA) tem sido utilizada para a avaliação da resposta inflamatória cutânea em aves, permitindo o estudo das relações entre o sistema imune e as condições ambientais. O presente trabalho foi delineado para investigar os fatores que modulam a suscetibilidade, patogenia e severidade das doenças infecciosas em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), avaliando e validando uma prova imunológica para a mensuração da resposta imune celular. **Métodos:** a partir do método apresentado por Martin et al. (Functional Ecology 20:290–299, 2006), será realizado o teste intradérmico de hipersensibilidade tardia à FHA, em 21 pinguins mantidos pela Sabina Parque Escola do Conhecimento, Santo André - SP. Na preparação para o teste intradérmico, 5 mg de FHA liofilizada (PHA-P L8754, SIGMA) serão diluídas em 5 mL de PBS estéril, alcançando a concentração de 1 mg/mL e mantidas sob refrigeração (4°C) até o momento do uso. Após a mensuração da membrana interdigital com um espessímetro digital (resolução 0,01 mm), a pata será inoculada com 0,1 mL de solução de PBS (pata esquerda) ou FHA (pata direita). Após 6, 24 ou 48 horas da aplicação (n = 7 em cada caso), os animais serão anestesiados com o emprego isoflurano e serão repetidas as mensurações interdigitais. Durante a anestesia, será efetuada uma biópsia do local de inoculação, utilizando *punches* descartáveis de 4 mm. O fragmento será acondicionado individualmente em formol 10% tamponado por 18 horas e posteriormente transferido ao etanol 70% para confecção de lâminas coradas com H&E. O infiltrado celular inflamatório será caracterizado e quantificado com o emprego de programas especializados (ImagePro Plus), e os resultados serão correlacionados com exames hematológicos (hematócrito, esfregaço, hemograma e bioquímica). **Conclusão:** a indução da resposta inflamatória a FHA tem sido utilizada em diversos estudos para quantificar a resposta imunológica de vertebrados selvagens, inclusive pinguins. Esses estudos baseiam-se na premissa de que o espessamento da pele após a injeção de FHA é um indicador acurado da resposta imune celular por linfócitos T; o que pode não ser sempre verdadeiro, já que a resposta imune cutânea nas distintas espécies é um processo dinâmico e complexo. Com o presente trabalho pretende-se qualificar e quantificar o processo inflamatório derivado da aplicação da FHA ao longo do tempo, indicando as mudanças no infiltrado e tipificando as células inflamatórias, de modo a verificar se essa prova imunológica apresenta uma real aplicabilidade para essas espécies. **Apoio Financeiro:** FAPESP (processo n. 2010/51801-5).

## PESQUISA DE INTEGRONS DE CLASSE I E II EM ESTIRPES DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CISNES NEGROS (*CYGNUS ATRATUS*) MANTIDOS NO PARQUE MUNICIPAL DO IBIRAPUERA EM SÃO PAULO, BRASIL

GUERRA, M. F. L.<sup>1</sup>; CUNHA, M. P. V.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, M. G. X.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, M. C. V.<sup>1</sup>; MARCATTI, R.<sup>2</sup>; NARDI, M. S.<sup>2</sup>; CAVALCANTE, E. M. G.<sup>2</sup>; MORENO, A. M.<sup>3</sup>; KNÖBL, T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPT/FMVZ-USP); <sup>2</sup>Seção de Medicina Veterinária Preventiva, Divisão Técnica de Medicina Veterinária e Manejo da Fauna Silvestre (DEPAVE-3), Secretaria do Verde e Meio Ambiente, Prefeitura Municipal de São Paulo; <sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS/FMVZ-USP).

**Introdução:** a avifauna aquática do município de São Paulo coabita com 12 milhões de habitantes. No meio urbano, ainda existem resquícios de vegetação e corpos d'água com flora e fauna associadas, como é o caso do Parque Municipal do Ibirapuera, que mantém uma densa avifauna aquática doméstica em semiliberdade e que eventualmente recebe aves selvagens visitantes, em busca de condições favoráveis de abrigo, alimentação e diminuta presença de predadores. A alta concentração de animais e matéria orgânica e a interação direta e indireta entre populações humanas e animais residentes ou visitantes implicam em preocupações sanitárias e ações de monitoramento e vigilância para detecção precoce de introdução de patógenos emergentes. Ressaltando ainda que águas de superfície são um importante fator na cadeia de disseminação de estirpes resistentes aos antimicrobianos, concomitantemente à capacidade de diferentes espécies bacterianas transferirem genes entre si. Além disso, aves associadas a ambientes aquáticos são consideradas indicadores de poluição ambiental. Dessa forma, o presente trabalho investigou a presença de genes intl codificadores de integrons de Classe I e II. **Métodos:** durante os meses de maio e junho de 2014 foram coletados swabs cloacais e/ou fecais de 60 cisnes negros cativos, residentes no Parque Municipal do Ibirapuera. Realizou-se o cultivo de bactérias em ágar MacConkey e, após incubação de 24 horas a 37°C, as amostras foram identificadas pelos métodos bioquímicos convencionais. Foram excluídas do estudo as estirpes de mesma espécie, isoladas do mesmo animal. Somente uma colônia isolada e pura foi transferida para caldo BHI e posteriormente submetida à extração de DNA bacteriano pelo método adaptado de Boom, para a realização de PCR com *primers* específicos para pesquisa de genes intl I e II. **Resultados:** das 60 estirpes de *E. coli* investigadas, o gene intl I foi detectado em 11 isolados, enquanto nenhuma expressou intl II. Integrons são elementos genéticos móveis capazes de capturar, expressar e transmitir genes cassetes de resistência antimicrobiana, frequentemente relacionados a perfis de multirresistência. Anátides são aves rústicas, pouco submetidas a tratamentos antimicrobianos, entretanto a avifauna estudada está inserida em uma área urbana de alto impacto antrópico. **Conclusão:** apesar da elevada frequência de integrons de classe I (18%) encontrados nas amostras desses animais, o papel da avifauna aquática atribuída ao panorama emergente da resistência bacteriana aos antimicrobianos ainda não está esclarecido, necessitando de estudos investigativos aprofundados. **Apoio Financeiro:** FAPESP (processo n. 2014/078376).

## IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO CARBAMATO ALDICARBE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTO DESEMPENHO ACOPLADA A DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (HPLC-DAD) EM CONTEÚDO ESTOMACAL DE CÃES E GATOS

FUKUSHIMA, A. R.<sup>1,2,3</sup>; BASTOS, S.<sup>1,2</sup>; SIQUEIRA, A.<sup>1</sup>; GONÇALVES, V. J.<sup>1</sup>; CALEFI, A. S.<sup>1</sup>; HAZARBASSANOV, N. Q.<sup>1</sup>; MAIORKA, P. C.<sup>1</sup>; FLORIO, J. C.<sup>1</sup>; SPINOSA, H. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, Brasil; <sup>2</sup>Universidade São Judas Tadeu (USJT), São Paulo, Brasil; <sup>3</sup>Universidade Guarulhos (UnG), São Paulo, Brasil.

**Introdução e Objetivos:** As intoxicações letais, via de regra, estão comumente relacionadas com a área médico-legal; alguns xenobióticos ocupam lugar de destaque como os principais responsáveis pela ocorrência desses óbitos. Em medicina legal, tanto humana quanto animal, o grande desafio enfrentado é a elucidação da causa *mortis* e do tempo da ocorrência da morte quando os cadáveres são encontrados, indicando possível exposição a xenobióticos, os quais são adicionados, na maior parte das vezes, intencionalmente, com a finalidade de causar danos irreversíveis à vítima. No último relatório do Sistema Nacional de Informações Tóxico Farmacológicas (SINITOX), no ano de 2010, foram relatadas no Brasil 88.270 intoxicações envolvendo seres humanos e animais, sendo que desse total 1.570 (1,8%) foram relatadas em animais. Existe uma visível discrepância numérica de casos de intoxicações em seres humanos e animais e a literatura mostra que as metodologias de análises toxicológicas em seres humanos são amplamente estudadas e publicadas quando comparadas às técnicas aplicadas à Medicina Veterinária Legal. Portanto, o desenvolvimento e a validação de técnicas analíticas mais sofisticadas se fazem-se necessários e contribuirão para os avanços nesse aspecto forense da toxicologia veterinária. É de amplo conhecimento que os praguicidas são responsáveis por intoxicações exógenas, intencionais ou não intencionais, em virtude de sua ampla toxicidade e dificuldade para realização de análises toxicológicas em amostras biológicas; as drogas utilizadas com finalidades recreacional e abusiva também têm grande importância nesse panorama. Nesse contexto, o aldicarbe é um dos principais representantes do grupo dos n-metilcarbamatos. Ele atua inibindo irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase que atua na metabolização de acetilcolina, o que lhe reserva alto grau de toxicidade, sendo um dos mais utilizados nas intoxicações propositais em animais. **Métodos:** Assim, no presente trabalho, foi padronizada uma metodologia analítica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), visando à análise de conteúdos estomacais de animais com suspeita de intoxicação por anticolinesterásicos (aldicarbe e carbofurano) provenientes do Serviço de Patologia Animal e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Pretende-se validar metodologia analítica voltada à análise dos praguicidas aldicarbe e metabólitos (aldicarbe sulfóxido e aldicarbe sulfona), carbofurano e forato, em matriz biológica, com finalidade forense. **Resultados:** O desenvolvimento do processo analítico mostrou-se adequado, sendo efetuadas 19 análises em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Apoio Financeiro:** CAPES, CNPq, FAPESP.

## CARACTERIZAÇÕES MACROSCÓPICAS E MICROSCÓPICAS DA INTOXICAÇÃO CRÔNICA POR COBRE EM OVELHA

RODRIGUES, D. M.<sup>1</sup>; LACERDA, A. M. D.<sup>1</sup>; SILVA, E. C.<sup>1</sup>; GOMES, R. G.<sup>1</sup>; TORRES, L. N.<sup>1</sup>; PINTO, F. C.<sup>1</sup>; DIAS, M. R. B.<sup>2</sup>; POGLIANI, F. C.<sup>2</sup>; SUCUPIRA, M. C. A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Patologia Animal, Hospital Veterinário (HOVET), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Serviço de Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes, Hospital Veterinário (HOVET), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução:** O cobre é um elemento essencial de todas as células, participando em reações enzimáticas, oxidativas, respiração celular e síntese de catecolaminas. A intoxicação cúprica pode ocorrer em todas as espécies animais, especialmente em ovinos, devido à sua baixa capacidade de excreção biliar. A intoxicação aguda geralmente causa um quadro de gastroenterite, enquanto a crônica resulta em uma síndrome hemolítica fatal e fulminante. A intoxicação por cobre pode ocorrer por um defeito primário no metabolismo do cobre no fígado, por uma excreção biliar do cobre alterada ou por administração excessiva de cobre na dieta. **Relato de Caso:** Uma ovelha de três anos foi encaminhada à Clínica de Bovinos e Pequenos Ruminantes (HOVET-FMVZ-USP) apresentando decúbito lateral, hemoglobinúria e mucosas amarronzadas, vindo a óbito logo em seguida. Os exames laboratoriais indicaram intensa anemia por hemólise e azotemia. A necropsia revelou intensa icterícia, sangue intravascular de aspecto hemolisado, rins de coloração enegrecida difusa e fígado amarelado com bordos arredondados e padrão lobular evidente. Microscopicamente, foi observado fibrose e atrofia acinar hepática difusa, moderada a severa, com hiperplasia biliar e colestase associadas; intensa congestão, hemossiderose e eritrofagocitose esplênica e rins com presença de incontáveis cilindros de hemoglobina, predominantemente nos túbulos contorcidos distais. **Discussão:** Os achados anatomopatológicos são consistentes com hemólise intravascular aguda e severa que, associados ao histórico clínico e anamnese, corroboram a suspeita de intoxicação cúprica crônica. O quadro hemolítico é decorrente da acumulação progressiva de cobre no fígado e sua liberação súbita. Esse acúmulo gera sucessivas lesões de mitocôndrias e lisossomos hepatocitários, levando à degeneração e necrose e à liberação do cobre acumulado, lesionando por sua vez as hemácias e culminando em dois quadros renais concomitantes: a necrose isquêmica, por hipoperfusão renal, secundária à anemia hemolítica, e o intenso depósito de cilindros de hemoglobina nos túbulos distais (a hemoglobinemia, devido à hemólise, supera a capacidade renal de transporte e excreção, gerando necrose tubular). A morte pode ocorrer entre 24 a 48 horas após a crise hemolítica.

**Conclusão:** suspeita-se que, nesse caso, a intoxicação ocorreu pelo excesso de cobre na alimentação ou suplementação do animal. A causa *mortis* deu-se por choque hipovolêmico, devido à hemólise intravascular severa, corroborada pelas alterações esplênicas e renais. Já os achados hepáticos caracterizam o quadro crônico do acúmulo progressivo de cobre.

## LIPOSSARCOMA EM *CAVIA PORCELLUS*: RELATO DE CASO

PAIXÃO, L. P.<sup>1</sup>; CALDERARO, F. F.<sup>2</sup>; PRAZERES, R. F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista (UNIP/SP); <sup>2</sup>MV Prof Dr do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista (UNIP/SP); <sup>3</sup>MV Prof Me do Setor de Pequenos Animais e Animais Selvagens e Exóticos do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Paulista (UNIP/SP).

**Introdução:** O lipossarcoma é uma rara neoplasia de tecido adiposo que acomete tanto seres humanos quanto outras espécies animais. A determinação do subtipo histológico e grau de diferenciação são importantes para o prognóstico e proposta terapêutica. A criação de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) como animal pet vem crescendo nos últimos anos devido ao seu bom temperamento e fácil manejo, sendo reconhecida a sua utilização como cobaia em biotérios. **Relato de Caso:** Foi atendida no Hospital Veterinário da Universidade Paulista uma cobaia fêmea, de cinco anos de idade, em mau estado geral e em decúbito lateral. No exame físico, evidenciou-se o membro pélvico direito com presença de massa firme ovoide com cerca de 8 cm x 4 cm, focos de úlceras e necrose, aderida ao tecido subcutâneo, estendendo-se por toda a face medial do membro e região inguinal. O paciente veio a óbito com a contenção e a biopsia incisional da massa foi encaminhada para exame histopatológico, pois a tutora não autorizou a realização de necropsia do animal. O fragmento foi definido como uma formação neoplásica caracterizada por proliferação de células grandes e redondas com o citoplasma amplo e macrovacuolizado e núcleo pequeno deslocado para a periferia com aspecto de adipócitos. Entre essas áreas diferenciadas, havia proliferação de células neoplásicas com pleomorfismo moderado, sendo pequenas, ovaladas ou fusiformes, com citoplasma escasso e microvacuolizado. Foram observadas células gigantes multinucleadas com citoplasma escasso e poucas figuras mitóticas. Foram observados focos de hemorragia, necrose e infiltrado inflamatório com predomínio de neutrófilos. Essa descrição histopatológica confirmou o diagnóstico de lipossarcoma bem diferenciado. **Discussão:** são raros os registros de lipossarcoma em *Cavia porcellus*, o que dificulta a compreensão do comportamento dessa neoplasia nessa espécie. A não realização de necropsia tornou a causa *mortis* indeterminada, porém o animal poderia estar anêmico pelas frequentes hemorragias no local e poderia ter metástases, apesar de não ser característico desse subtipo da neoplasia. Ainda, o comprometimento circulatório pela compressão de grandes vasos na região pode ter agravado o quadro. A longevidade desses animais, que vivem em média sete anos pode predispor o aparecimento de neoplasias e sugere-se na literatura que essa condição aumente a partir de três anos de idade. Nesse caso, a cobaia tinha cinco anos de idade, sendo provável a suspeita de neoplasia nesse animal. **Conclusão:** Este relato indica que o lipossarcoma deve ser um diagnóstico diferencial importante, a ser considerado nessa espécie pelo clínico.

### DESCRIÇÃO MORFOLÓGICA DO EPITÉLIO DE REVESTIMENTO DO SACO AÉREO NASOFRONTAL EM CACHALOTE ANÃO (*KOGIA SIMA*)

SACRISTÁN, C.<sup>1</sup>; COSTA- SILVA, S.<sup>1</sup>; GROCH, K.<sup>1</sup>; DUTRA, G.<sup>2</sup>; SÁNCHEZ-SARMIENTO, A. M.<sup>1</sup>; TORRES, L.<sup>1</sup>; LASSALVIA, C.<sup>2</sup>; REISFELD, L.<sup>1</sup>; CATÃO-DIAS, J. L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Aquário Municipal de Santos, São Paulo.

**Introdução:** o cachalote-anão (*Kogia sima*) é um cetáceo odontoceto pertencente à família Kogiidae que possui uma estrutura anatômica chamada espermacete. Estrutura semelhante também é encontrada em cachalote (*Physeter macrocephalus*), apesar de ser filogeneticamente distinto do cachalote-anão. O espermacete está envolvido na flutuabilidade e na produção de sons mediante uma complexa estrutura anatômica formada pelo espermacete, o melão, os lábios fônicos e diversos sacos aéreos, entre eles o saco aéreo nasofrontal. O saco aéreo nasofrontal repousa sobre a porção caudal da pré-maxila e apresenta parte do seu epitélio recoberto por estruturas esféricas a ovaladas, medindo cerca de 1 a 2 mm de diâmetro e compatíveis com vesículas. O presente trabalho descreve histologicamente o epitélio de revestimento do saco aéreo nasofrontal do cachalote-anão. **Métodos:** em 04/05/2014, um cachalote-anão encalhou na praia de Santos. O animal foi levado para o Aquário de Santos e veio a óbito em menos de 24 horas. Durante a necropsia, realizada logo após a morte do espécime, foram colhidas amostras da maioria dos tecidos e órgãos, fixadas em formol a 10% e congeladas. No exame macroscópico, a porção do saco aéreo nasofrontal aderida à pré-maxila encontrava-se revestida por um epitélio vesicular, de coloração esbranquiçada, distribuído de forma generalizada, mas irregularmente e firme ao corte. As estruturas mostravam tamanho uniforme (1-2 mm de diâmetro) e espaço cístico.

**Resultados:** microscopicamente, foram observadas vesículas formadas por abundante tecido conjuntivo, apresentando um espaço cístico no seu interior, com discreta quantidade de substância eosinofílica, cuja caracterização encontra-se pendente de estudos complementares, e componentes de natureza glandular em sua base. Essa estrutura foi descrita macroscopicamente por Clarke em 2003, sem haver, porém, a descrição de sua histologia. **Discussão**

**e Conclusão:** Acredita-se que o saco aéreo nasofrontal em cachalote-anão cumpra a mesma função que o saco aéreo distal nos cachalotes, pois ambos apresentam um revestimento vesicular e se relacionam com estruturas similares. No caso do cachalote-anão, as vesículas aparecem regulares e não septadas, diferentemente do que acontece nos cachalotes, nos quais são menos uniformes. Nos cachalotes, essas vesículas contêm um fluido seroso, sendo deformáveis, porém incompressíveis, mantendo espaço entre elas para conter o ar sob as grandes pressões em situações de mergulho, sem permitir o colapso do saco aéreo distal. Essa película de ar poderia atuar como um refletor de som. Acreditamos que a função das vesículas observadas no epitélio do saco aéreo nasofrontal em cachalote-anão poderia ser similar à observada nos demais cachalotes. **Apoio:** CAPES, FAPESP e Aquário Municipal de Santos.

### SCRENNING HIPOCRÁTICO DA EXPOSIÇÃO À *SENNA OCCIDENTALIS* POR 28 DIAS EM RATOS

SANTOS, M. V.; UDO, M. S. B.; SPINOSA, H. S.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

**Introdução e Objetivos:** A *Senna occidentalis*, ou fedegoso, pode ser encontrada em pastagens ou como invasora de lavouras. Apesar de ser popularmente empregada como anti-inflamatório e diurético para humanos, existem vários relatos de intoxicação accidental de animais de produção com as sementes dessa planta. As principais manifestações clínicas da intoxicação são: diarreia, abatimento, tremores musculares e andar cambaleante. O presente trabalho avaliou o potencial tóxico dessa planta, empregando o *screnning* hipocrático dos principais sinais clínicos da intoxicação em ratos expostos por 28 dias à ração contaminada com sementes de *Senna occidentalis* em diferentes concentrações (1, 2 e 4%). **Material e Métodos:** quarenta animais foram distribuídos em quatro grupos iguais (cinco machos e cinco fêmeas/grupo). Grupo controle: recebeu apenas ração comercial; os grupos 1, 2 e 3 receberam, respectivamente, ração com 1, 2 ou 4% das sementes de *Senna occidentalis* por 28 dias. Os animais foram observados diariamente na primeira semana e, posteriormente, semanalmente, por 15 minutos, quanto aos seguintes sinais clínicos: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, resposta ao aperto de cauda, reflexo corneal, resposta ao toque e piloereção. A presença/ausência de diarreia também foi registrada. Os resultados foram obtidos qualitativamente e avaliados por mediana de escores. **Resultados:** Os resultados da atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, reflexos auricular e corneal bem como a resposta ao toque na primeira semana foram semelhantes àqueles das semanas posteriores, entre os grupos experimentais e controle. Quanto ao parâmetro de aperto da cauda, os resultados indicaram uma sutil redução da resposta ao estímulo nas fêmeas dos grupos tratados quando comparadas ao controle, sinal este observado apenas nos machos de 1%. Em relação ao parâmetro piloereção, foi observado que a exposição à *Senna occidentalis* não causou alteração na primeira semana em nenhum dos grupos observados, porém, nas semanas subsequentes, houve um discreto grau de piloereção: nas fêmeas de 2% somente na segunda semana e nas fêmeas de 4% em todas as semanas subsequentes. Já os machos de 1% apresentaram o mesmo grau discreto de piloereção na terceira semana, os machos de 2% apresentaram na terceira e quarta semanas e os machos de 4% nas três semanas. O quadro de diarreia foi observado em todos os animais, exceto no grupo controle, somente nos primeiros dias de exposição. **Conclusão:** Os resultados indicam que concentrações de *S. occidentalis* na ração, administrada por 28 dias, causaram poucas alterações clínicas em ratos, exceto pela presença de diarreia em todos os grupos tratados. **Apoio Financeiro:** CAPES através de bolsa ao primeiro autor.

### ESTUDO FENOTÍPICO DE CAMUNDONGOS FÊMEAS SWISS ESPONTANEAMENTE OBESAS EM DIFERENTES FASES DA VIDA

TOBARUELA, C. N.; KLEIN, M. O.; MORI, C. M. C.; FELICIO, L. F.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

A obesidade é uma enfermidade caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que se tornou um grave problema de saúde pública. Assim, o desenvolvimento de modelos animais pode auxiliar na compreensão dos mecanismos envolvidos na doença bem como no desenvolvimento

de abordagens preventivas e terapêuticas. O presente trabalho avaliou o crescimento de camundongos fêmeas Swiss que se tornam espontaneamente obesas em idade avançada, oriundas do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP. Para isso, foram realizados dois experimentos: Exp. 1 - as fêmeas foram acompanhadas desde o dia pós-natal 1 (DPN<sub>1</sub>) até o DPN<sub>240</sub>; Exp. 2 - as fêmeas foram avaliadas do DPN<sub>280</sub> até o DPN<sub>485</sub>. Em cada experimento, os animais foram divididos em dois grupos: obesas (grupo OB; n=10) e não obesas (grupo NOB; n=10). Em ambos os experimentos foram realizados acompanhamento de peso corporal, medição de comprimento corporal e medição de circunferência abdominal. No DPN<sub>230</sub>, foi realizado o teste de tolerância à insulina (TTI) e no DPN<sub>232</sub>, o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) nas fêmeas do Exp. 1 e, da mesma forma, nos DPN<sub>420</sub> e 422, nas fêmeas do Exp. 2. Os resultados obtidos em cada experimento foram comparados separadamente por meio de ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni,  $p < 0,05$ . As fêmeas do grupo OB tinham circunferência abdominal e comprimento corporal maiores, comparadas ao grupo NOB, nos dois experimentos. No Exp. 1, ambos os grupos responderam à aplicação de insulina (TTI) e de glicose (TTOG) como esperado, não havendo diferença entre os grupos. Já no Exp. 2 houve diferença significativa na resposta à insulina entre os grupos OB e NOB (TTI), e as fêmeas OB tiveram maior pico de glicemia aos 20 minutos de teste e permaneceram por mais tempo com os níveis glicêmicos elevados (TTOG). Os animais do grupo OB dos Exp. 1 e 2 tiveram aumento significativo do ganho de peso corporal ao longo do tempo, atingindo cerca de 55g e 70g, respectivamente. No Exp. 1, o grupo OB mostrou ganho de peso elevado após o DPN<sub>81</sub>; também ocorreu efeito da interação tempo X grupo significativo, indicando que os grupos responderam de forma diferente ao longo do tempo. Portanto, as alterações de ganho de peso elevado, bem como, maior crescimento corporal e circunferência abdominal podem ser observadas nas fêmeas já no início da vida adulta. Entretanto, as alterações metabólicas aparecem apenas em idade avançada (Exp. 2). Assim, mais estudos são necessários para elucidar a origem das alterações fenotípicas encontradas.

**Apoio Financeiro:** CAPES.

### EFEITOS DA HIPERPROLACTINEMIA EM RATAS LACTANTES SOBRE A INFLAMAÇÃO ALÉRGICA PULMONAR (PROJETO)

PERGAMO, L. M.; TOBARUELA, C. N.; AMAYA, J. E. O.; FELICIO, L. F. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

A inflamação alérgica pulmonar, também conhecida como asma, é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, amplamente diagnosticada na atualidade, acometendo cerca de 235 milhões de pessoas no mundo todo. Estima-se que, no Brasil, cerca de 10% da população sofra com o problema. A hiperprolactinemia é definida como o aumento dos níveis do hormônio prolactina (PRL), o que pode ocorrer normalmente durante a gestação e a lactação, estando relacionada com a produção de leite materno. O PRL também possui ações imunomodulatórias, o que sugere que esse hormônio possa ter diferentes funções no sistema imune, tais como a manutenção da função basal dos linfócitos ativados. O presente projeto pretende avaliar os efeitos da hiperprolactinemia produzida durante a lactação sobre a resposta inflamatória alérgica pulmonar em ratas lactantes sensibilizadas e desafiadas com a ovoalbumina (OVA). Ratas Wistar, oriundas do biotério do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, serão divididas em dois grupos: grupo lactante (Lac - n = 10), no qual as fêmeas serão acasaladas para obtenção da prenhez, e grupo controle (Con - n = 10), com ratas virgens durante todo o período de estudo. No grupo Lac, o dia em que for observada a presença de

espermatozoides no lavado vaginal será considerado como dia de prenhez (DPo). Nos DP 7 e 14, as fêmeas serão sensibilizadas com aplicação subcutânea de 10 µg de ovoalbumina (OVA) juntamente com 10 mg de hidróxido de alumínio preparados em solução salina, na dose de 0,7 ml/animal. Após o parto, no dia pós-natal 2 (DPN 2), as ninhadas serão padronizadas com 8 filhotes cada (4 machos e 4 fêmeas sempre que possível). Nos DPN 3, 4 e 5, as ratas lactantes serão submetidas diariamente a um desafio com a OVA (1% em PBS), administrada em uma câmara de inalação conectada a um nebulizador ultrassônico, o qual gera uma neblina (tamanho médio 0,5 - 1,0 µm); o tempo de exposição à OVA via aerossol será de 15 minutos diários. O grupo Con será submetido aos mesmos procedimentos de sensibilização e desafio que o grupo Lac, considerando a fêmea virgem aos 80 dias de vida para início do processo (equivalente ao DP 0 no grupo Lac). No dia seguinte à última sessão de desafio, será realizada a eutanásia dos animais, quando serão obtidas amostras de sangue periférico, lavado bronco alveolar e coleta da medula óssea para posterior contagem de leucócitos totais e diferenciais nas mesmas. Os animais também serão avaliados quanto à atividade pró-inflamatória da PRL, visando estabelecer se a hiperprolactinemia ocasionada naturalmente durante a lactação interfere na resposta imunológica à inflamação alérgica pulmonar.

### PAPEL DOS ADRENOCEPTORES $\beta$ EM CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONÓCITOS EM UM MODELO TUMORAL *IN VITRO*. (PROJETO EM ANDAMENTO)

CRUZ, D. S. G.; MASSOCO, C. O.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução e Objetivos:** O microambiente tumoral consiste de vários tipos celulares, incluindo células do sistema imune. Essas células podem reconhecer e destruir as células tumorais, mas, em determinadas condições, são recrutadas e podem favorecer os tumores, fornecendo substratos para o crescimento tumoral. O impacto do efeito de estressores psicossociais em situações patológicas, como o câncer, vem sendo demonstrado em estudos básicos, clínicos e epidemiológicos, os quais têm correlacionado crescimento tumoral, progressão e metástase com situações de estresse, ansiedade, depressão, dentre outras anormalidades psicológicas e comportamentais. O estresse culmina na liberação de glicocorticoides e catecolaminas, como a adrenalina e a noradrenalina, que podem se ligar em adrenoreceptores de células tumorais. De fato, esses hormônios do estresse parecem favorecer a proliferação celular, evasão da apoptose, migração e invasão, além de metástases e angiogênese nos tumores. Além das células tumorais, algumas células do sistema imunológico também possuem adrenoreceptores, o que sugere que essas células também possam sofrer regulação por esses receptores. Em especial, as Células Dendríticas (DCs) vêm sendo amplamente estudadas no microambiente tumoral, uma vez que essas células fazem a ligação entre a imunidade inata e adaptativa, tendo potencial para gerar respostas voltadas contra os tumores. As DCs, no entanto, também estão sujeitas às disfunções imunes geradas no câncer, podendo adquirir fenótipo e funções de células tolerogênicas. Essas células, agindo em condições patológicas, podem inibir a geração de uma resposta imune eficiente, voltada contra os tumores. **Material e métodos:** no presente trabalho, inicialmente, será avaliada a expressão de receptores beta adrenérgicos em DCs geradas *in vitro* a partir de células periféricas mononucleares sanguíneas humanas (hPBMCs). Posteriormente, os adrenoreceptores serão testados para revelar se os mesmos são funcionais nessas células. Por fim, as DCs serão cultivadas com agonistas e antagonistas

adrenérgicos na presença de células tumorais, com o intuito de verificar o comportamento das DCs nesse microambiente. Nessa etapa, as DCs serão avaliadas fenotipicamente por ensaios funcionais. **Resultados Parciais:** a expressão protéica dos subtipos de adrenoceptores  $\beta$  foi avaliada pela técnica de Western Blot. Tanto as DCs imaturas quanto as maduras expressaram o subtipo  $\beta_1$ , mas não os subtipos  $\beta_2$  e  $\beta_3$ . **Conclusões Parciais:** após a confirmação dos adrenoceptores expressos em DCs, espera-se com este trabalho investigar o comportamento dessas células quando moduladas por agentes adrenérgicos em um modelo tumoral *in vitro*, visando a investigação de como a alteração da função dessas células no estresse pode influenciar na progressão do câncer.

### CARACTERIZAÇÃO BIOMÉTRICA, DENSITOMÉTRICA E HISTOLÓGICA DO RÁDIO E FÊMUR DE *CALLITHRIX SPP* AO ZERO DIA DE VIDA

RAMOS, S. D.<sup>1</sup>; LÓPEZ, A. C. C.<sup>1</sup>; UNRUH, S. M.<sup>2</sup>; HAGEN, S. C. F.<sup>2</sup>; SÁ, L. R. M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Gastroenterologia Experimental e Comparada em Patologia Ambiental, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP); <sup>2</sup>Serviço de Diagnóstico por Imagem, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

**Introdução:** os ossos apresentam variação no seu modo de formação, crescimento, estrutura e função e são responsáveis por suporte e proteção do corpo. No contexto de saúde e condição de vida, o desenvolvimento ósseo adequado é essencial para que o indivíduo se torne um adulto saudável. O objetivo deste estudo é caracterizar o tecido ósseo de rádio e fêmur de filhotes de zero dias de *Callithrix spp.*, nascidos em cativeiro, do ponto de vista qualitativo e quantitativo, envolvendo análise biométrica, histológica e por densitometria óptica radiográfica. **Materiais e Métodos:** Foi realizado o estudo observacional retrospectivo de 15 carcaças de neonatos de saguis com zero dia de vida, que vieram a óbito em criador comercial. Foram analisados 10 *Callithrix penicillata*, quatro *C. jacchus* e um *Callithrix spp.*, sem considerar-se o gênero. Os comprimentos em milímetros do radial-estilóide e trocântero-tibial lateral foram obtidos com uso do paquímetro. As imagens radiográficas, efetuadas com um penetrômetro, foram avaliadas com o programa Synapse®. Os fragmentos descalcificados em corte longitudinal do rádio e fêmur foram processados para exame microscópico. **Resultados:** O comprimento médio do rádio foi  $18,21 \pm 0,999$ mm, e do fêmur,  $20,17 \pm 1,137$ mm, considerando as três espécies ( $p > 0,05$ ). Os resultados densitométricos médios para as três espécies foi  $0,615 \pm 0,125$  mmAl,  $0,766 \pm 0,157$  mmAl,  $0,607 \pm 0,138$  mmAl, respectivamente, para as regiões de metafises proximal, distal e diáfise do rádio e foi  $0,723 \pm 0,212$  mmAl,  $0,856 \pm 0,238$  mmAl,  $0,802 \pm 0,203$  mmAl, respectivamente, para as regiões de metafises proximal, distal e diáfise do fêmur ( $p > 0,05$ ). Histologicamente, as espécies apresentaram vacuolização dos condrocitos localizados na região de aparecimento dos centros secundários de ossificação no rádio e o disco epifisário proximal e distal de ambos os ossos caracterizaram-se por zona hipertrófica com septos calcificados finos, colunas de duas a 12 células globosas e zona de calcificação com traves finas e irregulares. **Conclusão:** Este foi o primeiro registro de biometria, densitometria óptica radiográfica e características histológicas do rádio e fêmur em saguis de zero dia de vida nascidos em cativeiro, e passam a ser disponibilizados como referência para o estabelecimento do padrão de normalidade em infantes de *Callithrix spp* aos zero dia de vida nascidos

em cativeiro. **Apoio Financeiro:** Universidade de São Paulo, bolsa de iniciação científica institucional (RUSP).

### INFLUÊNCIA DA IVERMECTINA NA MOTIVAÇÃO SEXUAL E NOS NÍVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA EM RATOS

MOREIRA, N.<sup>1</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.<sup>2</sup>; BERNARDI, M. M.<sup>3</sup>; SPINOSA, H. S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), São Paulo, SP; <sup>2</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), São Paulo, SP; <sup>3</sup>Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Paulista (UNIP), São Paulo, SP.

**Introdução:** A ivermectina (IVER) é um antiparasitário do grupo das avermectinas, amplamente usado em Medicina Veterinária para o combate de endo e ectoparasitos. Em mamíferos, diversas evidências indicam que essas substâncias químicas interagem com canais de cloro mediados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA) e esse sistema de neurotransmissão participa da manifestação do comportamento sexual. **Objetivo:** Avaliar se a exposição à IVER é capaz de interferir na motivação sexual e nos níveis séricos de testosterona de ratos. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar distribuídos em três grupos de dez animais, dois experimentais e um controle. Os ratos dos grupos experimentais receberam 0,2 ou 1,0 mg/kg de IVER, pela via intraperitoneal (IP); os ratos do grupo controle receberam pela mesma via 1 ml/kg de solução salina (NaCl 0,9%). Após 15 minutos e 24 horas da administração de IVER ou salina, foi efetuada a avaliação da motivação sexual e, às 24 horas, a dosagem de testosterona no sangue. A motivação sexual foi avaliada em uma arena delimitada por uma parede metálica, com dois compartimentos localizados nas extremidades laterais da arena, nos quais foram colocados os ratos iscas (uma fêmea no estro e um macho); mede-se o tempo e a frequência com que o rato teste fica nas proximidades dos ratos iscas. Assim, foram avaliados o número de entradas na zona de incentivo do macho (ZIM) e da fêmea (ZIF), e o tempo total na ZIM e na ZIF. Para a concentração de testosterona no sangue, os níveis séricos foram determinados pela técnica de enzima imunoensaio de duplo anticorpo, empregando-se kits comerciais. **Resultados:** Em relação à motivação sexual, a ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes em nenhum dos parâmetros, tanto em relação aos grupos como em relação ao tempo. Quanto aos níveis séricos de testosterona, a ANOVA de uma via mostrou diferenças significantes entre os grupos e o teste de Dunnett revelou redução do nível de testosterona na dose de 1,0 mg/kg em relação ao grupo controle. **Conclusão:** Achados anteriores mostraram que 1,0 mg/kg IVER, via IP, 15 minutos após a administração prejudicou o comportamento sexual dos machos (aumento da latência para a monta e intromissão), sendo sugerido que esse efeito poderia ser atribuído ao estado motivacional do animal. Frente a essa questão, este estudo buscou avaliar a motivação sexual de ratos machos, e verificou que o prejuízo do comportamento sexual, observado em achados anteriores, não pode ser conferido a aspectos sexuais motivacionais. Todavia, a redução dos níveis de testosterona pode ser atribuída a disfunções sexuais.

**Apoio Financeiro:** CNPq e CAPES.

## **AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA DA HEMOSSIDEROSE HEPÁTICA EM PINGUINS-DE-MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) NATURALMENTE INFECTADOS POR *PLASMODIUM SPP* (PROJETO EM ANDAMENTO)**

EWBANK, A. C.<sup>1</sup>; VANSTREELS, R. E. T.<sup>2</sup>; STREFEZZI, F. R.<sup>3</sup>; CATÃO-DIAS, J. L.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, SP, Brasil; <sup>2</sup>Aiuká – Consultoria em Soluções Ambientais; <sup>3</sup>Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, Brasil; <sup>4</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução e Objetivos:** Pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) debilitados, que atingem a plataforma continental brasileira durante sua migração invernal, recebem atendimento em centros de reabilitação ao longo do litoral. Nesse período os animais são suscetíveis à malária aviária, doença capaz de desencadear surtos fulminantes, com altas taxas de mortalidade, e de aspecto epizootico, representando uma ameaça à conservação de espécies suscetíveis. Resultados recentemente obtidos sugeriram a existência de correlação entre o desenvolvimento desses animais e a ocorrência de hemossiderose hepática. O presente trabalho empregou técnicas histoquímicas e morfométricas para identificar e quantificar os padrões morfológicos da hemossiderose hepática em pinguins-de-Magalhães naturalmente infectados com *Plasmodium spp.*, previamente caracterizados por meios morfológicos e moleculares. **Material e Métodos:** foram examinadas amostras de fígado de 21 animais pertencentes ao Banco de Tecidos de Animais Selvagens do LAPCOM. As técnicas de Reticulina e Giemsa foram utilizadas para a análise e descrição histopatológica. Lâminas com coloração de Perls foram examinadas ao microscópio com uso de sistema computadorizado de análise de imagem (Image ProPlus, version 5.1.2.59, Media Cybernetics). O centro da lâmina foi fotografado e utilizado como campo de referência à objetiva de 40x. Outras oito imagens foram gravadas como arquivos TIF, a 50µm desse ponto, a intervalos de 45°, sob as mesmas condições de luminosidade. Os depósitos de hemossiderina foram delineados semiautomaticamente, a partir da mais baixa intensidade de azul até a mais alta. O zoom digital máximo foi padronizado em 50%. O valor médio das porcentagens de áreas ocupadas por hemossiderina em nove campos foi denominado índice de hemossiderose hepática (IHH). **Resultados e Discussão:** as amostras encontram-se em processo de análise morfométrica. O IHH individual será comparado aos parâmetros: instituição de origem, espécie de *Plasmodium* infectante e alterações histopatológicas. Os resultados serão analisados por Análise de Variância ou Testes de Correlação, dependendo do tipo de dado em questão. O maior desafio será o estabelecimento da correlação e contextualização dos resultados obtidos com o histórico disponível no período de ingresso nos centros de reabilitação. **Conclusão:** a ocorrência de hemossiderose em aves com malária já foi relatada anteriormente, mas esta será a primeira vez que a sua extensão, registrada por avaliação histopatológica, morfometria e mensuração do IHH, será comparada com a espécie de *Plasmodium* infectante em pinguins-de-Magalhães. Será investigada a existência de correlação entre hemossiderose e a malária aviária, bem como, a sua significância e quais morfoespécies de *Plasmodium* causam hemossiderose mais acentuada. **Apoio Financeiro:** CAPES e FAPESP.

## **SHORT-TERM HYPERPROLACTINEMIA DECREASES ALLERGIC INFLAMMATORY RESPONSE OF THE LUNGS**

OCHOA-AMAYA, J. E.<sup>1,4</sup>; HAMASATO, E. K.<sup>1</sup>; TOBARUELA, C. N.<sup>1</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.<sup>1</sup>; ANSELMO-FRANCI, J. A.<sup>2</sup>; PALERMO-NETO, J.<sup>1</sup>; GREIFFO, F. R.<sup>3</sup>; DA SILVEIRA, E. C.<sup>3</sup>; DE PAULA-VIEIRA, R.<sup>3</sup>; LIGEIRO DE OLIVEIRA, A. P.<sup>3</sup>; MASSOCO, C. O.<sup>1</sup>; FELICIO, L. F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo, SP; <sup>2</sup>Laboratório de Neuroendocrinologia da Reprodução, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, São Paulo, SP; <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Biofotônica Aplicada às Ciências da Saúde, Universidade Nove de Julho, São Paulo, Brasil; <sup>4</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales, Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colômbia.

**Purpose:** the present study evaluated the effects of short-term hyperprolactinemia induced by domperidone before ovalbumin antigenic challenge on the lung's allergic inflammatory response. **Materials and Methods:** animals and experiment outline male rats aged 60 to 90 days old were divided randomly into four groups; a naïve group (N) with no treatment and no lung allergy; a control group (C), a vehicle group (V), and domperidone group (D) with induced lung allergy and respective treatments. On day 0, all animals of groups (C), (V) and (D) were injected with OVA and were boosted on day 7. Between days 10 to 14, group (D) was treated with domperidone as described previously, whilst group (V) was administered NaCl 0,9%. On days 15, 16 and 17, animals in groups (C), (V) and (D) received OVA in aerosol form to induce lung allergy. Allergic lung inflammation model in rats were sensitized by 10 µg ovalbumin (OVA; Egg Albumin Grade II) and 10 mg of aluminum hydroxide, dissolved in PBS (phosphate-buffered saline) and administered by subcutaneous injection (day 0) at a dose of 01 mg.kg<sup>-1</sup>. One week later (day 7), rats were boosted subcutaneously receiving the same treatment. For the challenge with OVA aerosol (1% in PBS) animals were individually placed in an inhalation chamber connected to an ultrasonic nebulizer for 15 minutes per day for three consecutive days (days 15, 16, 17). Experimental hyperprolactinemia to induce hyperprolactinemia, domperidone was injected in rats at a dose of 5.1 mg.kg<sup>-1</sup> per day, i.p., for 5 days. Total and differential leukocyte counts from bronchoalveolar lavage (BAL), femoral marrow lavage (FML), and blood were analyzed. The percentages of mucus and collagen production were evaluated microscopically. Enzyme-linked immunosorbent assays were performed to measure serum corticosterona, adrenaline and prolactin levels and interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) expression in lung explants. **Results:** the rats that were subjected to short-term hyperprolactinemia exhibited a decrease in leukocyte counts in bronchoalveolar lavage, cellularity decrease in femoral marrow lavage fluid, a lower percentage of mucus and concentration of serum adrenaline, whereas it was observed an increase in lung IL-4, IL-6, IL-10, and TNF-alpha expression. **Conclusion:** hyperprolactinemia induced before antigenic challenge decreased allergic lung inflammation. These data suggest that prolactin may play a role in the pathophysiology of asthma, and shows also the involvement of the sympathetic nervous system (SNS) through serum adrenaline reduction. The present study demonstrates a prospective beneficial side effect of domperidone for asthmatic patients. **Gratefully acknowledge the following grants:** 09/51886-3 FAPESP and 5984-11-4 CAPES.

## ESTUDO RETROSPECTIVO (2003-2012) DO PERÍODO DE INCUBAÇÃO DE AMOSTRAS POSITIVAS PARA RAIVA DE DIFERENTES ESPÉCIES INOCULADAS EM CAMUNDONGOS

JARCOVIS, R. L. M.<sup>2</sup>; GAMON, T. H. M.<sup>1</sup>; NOGI, K. I.<sup>2</sup>; FAHL, W. O.<sup>2</sup>; ASANO, K. M.<sup>2</sup>; ACHKAR, S. M.<sup>2</sup>; MAIORKA, P. C.<sup>1</sup>; MORI, C. M. C.<sup>1</sup>; MORI, E.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), São Paulo/SP, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Pasteur. Avenida Paulista, 393, 01311-000, São Paulo/SP, Brasil.

**Introdução e Objetivos:** a prova biológica (PB) de inoculação intracerebral (IC) em camundongos com o vírus da raiva (RABV) apresenta sensibilidade diagnóstica superior ao teste de imunofluorescência direta (IFD). No entanto, o tempo necessário para o diagnóstico pela PB é maior que o consumido pela IFD, pois é dependente do período de incubação (PI) viral após inoculação IC. A determinação da duração desses períodos de observação (PO) em camundongos após inoculação IC com RABV foi estabelecida por observações empíricas. Com o intuito de estabelecer a duração do PO dos camundongos da linhagem Swiss inoculados IC com amostras clínicas (SNC, saliva e líquor) positivas para raiva, provenientes de diferentes espécies animais e humanos, oriundos do setor de Diagnóstico do Instituto Pasteur de São Paulo, foi realizado um estudo retrospectivo de dez anos do PI para raiva em camundongos inoculados pela via intracerebral. **Material e Métodos:** foi realizado o levantamento de dados constantes das fichas de observação de camundongos inoculados com o vírus da raiva do Instituto Pasteur, abrangendo o período de janeiro de 2003 a dezembro de 2012. **Resultados e Discussão:** Das amostras raiva positivas, observaram-se os seguintes PI, com valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (mínima e máxima): 10,5 $\pm$ 3,2 (5-18) dias para 92 amostras de humanos; 11,4 $\pm$ 3,8 (6-37) dias para 489 amostras de quirópteros; 10,8 $\pm$ 2,8 (5-24) dias para 484 amostras de bovinos, 12,2 $\pm$ 5 (6-43) dias para 172 amostras de cães; 12,3 $\pm$ 4,1 (6-27) dias para 133 amostras de equinos; 11,3 $\pm$ 4 (6-21) dias para 30 amostras de felinos; 12,3 $\pm$ 3,5 (6-25) dias para 118 amostras de raposas; 9,4 $\pm$ 3,1 (6-16) dias para 23 amostras de primatas não humanos; 12,3 $\pm$ 3 (9-16) dias para quatro amostras de ovinos; 10,6 $\pm$ 3,8 (6-15) dias para cinco amostras de caprinos; 12 $\pm$ 3,9 (7-16) dias para cinco amostras de suínos; 23,5 $\pm$ 10,6 (16-31) dias para duas amostras de muare; 14 $\pm$ 1,4 (13-15) dias para duas amostras de asininos; 21,5 $\pm$ 10,6 (14-29) dias para duas amostras de guaxinins; 10 dias para uma amostra de bubalino. **Conclusão:** Conclui-se que os PI nos camundongos inoculados IC entre as diferentes amostras de animais e de humanos apresentaram resultados semelhantes, sendo que o PO inferior a 21 dias tradicionalmente adotado por alguns laboratórios no diagnóstico para raiva, contemplaria a maioria das amostras raiva positivas pela PB (98,2% das amostras de quirópteros; 99,6% das amostras dos bovinos; 95,3% das amostras de cães; 95,5% das amostras de equinos; 98,3% das amostras de raposas; 100% das amostras de humanos, felinos, primatas não humanos; caprinos, ovinos, suínos, asininos e bubalinos). No entanto, em virtude de algumas amostras apresentarem PI superior a 21 dias, sugere-se em alguns casos, como em animais silvestres, equídeos e cães, seja adotado um PO de pelo menos 30 dias.

## PNEUMONIA INTERSTICIAL PARASITÁRIA ASSOCIADA À *PARAFILAROIDES* SP EM LOBO-MARINHO SUB-ANTÁRTICO (*ARCTOCEPHALUS TROPICALIS*) NO LITORAL DE SANTA CATARINA

COSTA-SILVA, S.<sup>1</sup>; MARIGO, J.<sup>1</sup>; GROCH, K. R.<sup>1</sup>; SACRISTÁN, C. Y.<sup>1</sup>; SANCHEZ-SARMIENTO, A. <sup>1</sup>; EBERT, M.<sup>1</sup>; HOLZ, A. C. <sup>2</sup>; SCHULZE, B.<sup>2</sup>; SARTORI, C. M. <sup>2</sup>; PAITACH, R. L. <sup>2</sup>; DOS SANTOS, N. Z. <sup>2</sup>; CREMER, M. J.<sup>2</sup>; CATÃO-DIAS, J. L.<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia experimental e comparada da Faculdade de Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).  
2. Laboratório de Nectologia, Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE).

**Introdução:** os pinípedes são mamíferos marinhos compreendidos principalmente pelas focas e lobos marinhos (ordens Phocidae e Otariidae). Os *Parafilaroides* sp são nematoides pertencentes à família Metastrongylidae, geralmente encontrados em alvéolos e bronquíolos e, com menor frequência, em brônquios desses animais. **Relato de caso:** um lobo marinho sub-antártico (*Arctocephalus tropicalis*), macho, subadulto (1,57m) foi encontrado morto na Praia do Forte (-26°,16776S/-48°,52916 W), em São Francisco do Sul, litoral norte de Santa Catarina, no dia 19/08/13. O animal foi levado para a Unidade São Francisco do Sul/UNIVILLE (-26, 21810°W/-48, 57163°S), onde foi mantido congelado até a necropsia realizada no dia 26/06/14 pela equipe de pesquisadores do LAPCOM/FMVZ/USP, juntamente com a equipe do Projeto Toninhas/UNIVILLE. As principais alterações encontradas durante o exame necroscópico foram caquexia, úlceras pilóricas estomacais, provavelmente associadas à presença de embalagem plástica visualizada durante a necropsia, nematoides gastrointestinais (Anisakidae), nematoides em luz bronquial e material espumoso em traqueia. Ainda, macroscopicamente os pulmões apresentavam lesões miliares multifocais amarelo-esbranquiçadas com o centro enegrecido variando de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro, elevadas, distribuídas de forma generalizada pelo parênquima pulmonar e na região subpleural e contendo pequenos nematoides. Amostras de múltiplos tecidos e órgãos foram colhidas e fixadas em formol 10%. Concomitantemente, foi realizada cultura microbiológica a partir de swabs com meio de Stuart colhidos do parênquima pulmonar. Na microscopia foi observada pneumonia intersticial predominantemente mononuclear multifocal associada à congestão e hemorragia moderada-severa, com marcantes áreas de enfisema adjacentes aos parasitas adultos. Também foram observadas estruturas compatíveis com larvas parasitárias em processo de calcificação distrófica no interstício pulmonar. A identificação parasitária é compatível, morfológicamente, com *Parafilaroides* sp. A confirmação molecular está sendo realizada paralelamente a esse estudo. **Discussão e conclusão:** a infestação por *Parafilaroides* sp pode causar sérias complicações, incluindo processos respiratórios fatais, em hospedeiros imunocomprometidos. No presente relato os parasitas pulmonares tiveram provavelmente uma contribuição importante no quadro clínico respiratório e óbito do animal. Investigações complementares estão sendo realizadas em busca de possíveis agentes imunodepressores. **Apoio:** CAPES, FAPESP, UNIVILLE e PETROBRAS - Ambiental. **Agradecimentos:** Sândara Squario e Laura Reisfeld.

## ESTUDO RETROSPECTIVO DOS CASOS DE CÂNCER ATENDIDOS NO HOSPITAL MUNICIPAL VETERINÁRIO DE SÃO PAULO DE JULHO DE 2012 ATÉ JULHO DE 2013

TEDARDI, M.V.<sup>1</sup>, GRANDI, F.<sup>2</sup>, BESERRA, H. E. O.<sup>2</sup>, ATUI, F. P.<sup>1</sup>, PAIVA, H.B.R.<sup>3</sup>, KIMURA, K.C.<sup>1</sup>, PEDRA-MENDONÇA, P.<sup>4</sup>, LATORRE, M.R.D.O.<sup>5</sup>, IBAÑEZ, J.F.<sup>3</sup>, DAGLI, M.L.Z.<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 3. Hospital Veterinário Municipal de São Paulo, Serviço Anclivepa. 4. Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 5. Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** os registros de câncer são importantes por identificarem fatores de risco, avaliarem a resposta aos tratamentos e permitirem a caracterização e a distribuição geográfica da doença. Em maio de 2013 o Núcleo de Apoio à Pesquisa em Oncologia Veterinária (NAP-ONCOVET) fundou o Registro de Câncer Animal de São Paulo (RCA-SP), o primeiro da América Latina. O Hospital Veterinário Municipal de São Paulo (HMVSP) é parceiro do RCA-SP e o presente trabalho descreve os casos de câncer atendidos pela instituição após um ano de atendimentos. **Materiais e métodos:** Coleta de dados: estudo retrospectivo dos casos de neoplasias malignas em cães atendidos no HMVSP pelo Registro de Câncer Animal de São Paulo entre julho de 2012 e julho de 2013 e que obtiveram confirmação diagnóstica por exame histopatológico. Casos duplicados e recidivas foram excluídos da base de dados. Codificação e padronização de informações: as raças caninas foram listadas e codificadas segundo a Fédération Cynologique Internationale (FCI) e a raça de gatos segundo a Fédération Internationale Féline (FIFE). A lista das localizações e diagnósticos morfológicos foram adaptados da Classificação Internacional de Doenças para Oncologia, 3ª edição (CID-O-3). O software R (versão 3.0.2, 2013, R Foundation for Statistical Computing) foi utilizado para a análise dos dados. **Resultados e discussão:** a amostra da base de dados é constituída predominantemente por cães (96,46%), sendo a sua maioria fêmeas (82,50%), com a média de 10,04 anos de idade, desvio padrão de 3,11 anos. A localização neoplásica primária mais frequente foi a mama (66,13%) seguida pelas neoplasias cutâneas (17,82%) e genitais (5,62%). As localizações primárias menos frequentes foram trato urinário (0,32%), olho (0,32%) e sistema respiratório (0,16%). Esses resultados variam conforme região geográfica, sendo que câncer de mama em cadelas varia de 30 a 45% dos casos atendidos na Dinamarca, Itália e Inglaterra, e a ocorrência de neoplasias cutâneas de 20 a 40% nos mesmos países. A neoplasia mamária maligna mais frequente foi o carcinoma em tumor misto (44,8%), seguida do carcinoma complexo (14,88%) e do carcinoma tubular simples (11,22%). Os grupos neoplásicos cutâneos mais frequentes foram carcinomas (33,33%), neoplasias mesenquimais de células redondas (27,93%) e mesenquimais de células fusocelulares (13,51%). Os tipos histológicos mais frequentes em pele foram o mastocitoma (23,42%), o carcinoma de células escamosas (18,92%) e o hemangiossarcoma (10,81%). **Conclusão:** O Hospital Veterinário Municipal de São Paulo atende predominantemente cães com câncer em mama, pele e genitais. **Apoio financeiro:** FAPESP (processos nº 2012/10957-8 e 2013/04434-5).

## CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVO PRIMÁRIO DE CÉLULAS ORIUNDAS DE CARCINOMAS MAMÁRIOS EM CÃES

CORDEIRO, Y. G.<sup>1</sup>; BRASIL, E. C.<sup>1</sup>; GOMES, S. A.<sup>1</sup>; XAVIER, P. L. P.<sup>1</sup>; STREFEZZI, R. F.<sup>1,2</sup>; FUKUMASU, H.<sup>1,2</sup>

1. Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional, LOCT, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP. 2. Prof. Dr. Departamento de Medicina Veterinária. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP.

**Introdução e objetivos:** o desenvolvimento e a caracterização de modelos para o estudo de neoplasias humanas e animais é de extrema relevância para a melhoria do diagnóstico e tratamento do câncer. Os carcinomas de mama espontâneos caninos, assim como em mulheres, são uma das neoplasias mais frequentes e com grande índice de mortalidade nos indivíduos afetados. Apresentam diversas semelhanças histológicas e moleculares com os carcinomas humanos, razão pela qual se tem dado cada vez mais importância para o estabelecimento de modelos para estudos *in vitro*. O presente trabalho caracterizou as linhagens celulares provenientes de neoplasia de glândula mamária em cadelas. **Métodos:** seis amostras de neoplasias mamárias foram coletadas a partir de mastectomias realizadas em clínicas veterinárias particulares. Após a dissociação mecânica e enzimática dos fragmentos, os materiais foram cultivados em meio DMEM-F12 suplementado com 0,5% de soro fetal bovino, 1% MEGS (Mammary Epithelial Growth Supplement, Life Technologies) e 1% de antibiótico/antimicótico, em ambiente controlado, até a estabilização do cultivo primário. Para a caracterização celular, foram realizadas: marcações imunocitoquímicas para citoqueratina (clone A1/A3), vimentina (V9) e  $\alpha$ -actina (clone HHHF35); avaliação citogenética por cariotipagem nos materiais submetidos à coloração de Giemsa; e cálculo do tempo de duplicação dos cultivos, baseado em um intervalo de 24 horas por um período de seis dias. **Resultados:** todos os cultivos celulares se mostraram viáveis e permanecem estáveis até o presente momento. As células apresentaram uma forte expressão de citoqueratina e vimentina indicando um alto grau de malignidade, uma vez que a co-expressão destes filamentos intermediários tem sido relacionada com um perfil tumoral mais invasivo. A análise citogenética revelou aneuploidia em cerca de 50% das células cancerosas dos animais, confirmando a instabilidade genômica característica das neoplasias. O tempo de duplicação dos cultivos variou de 20 a 50 horas, apesar das condições de cultivo celular terem sido iguais para todas as amostras avaliadas. **Conclusão:** foi possível a caracterização dos cultivos celulares oriundos de neoplasias mamárias em cães. Os resultados obtidos concordam com os registrados em trabalhos semelhantes, tanto para linhagens humanas, quanto animais, sugerindo que as linhagens celulares obtidas poderão ser utilizadas no futuro visando o progresso no diagnóstico e tratamento do câncer. **Apoio Financeiro:** CAPES e CNPQ.

### TUMORAÇÃO INTRACELOMÁTICA EM UM COLEIRINHA (*SPOROPHILA CAERULESCENS*)

LACERDA, A.M.D.<sup>1</sup>; SILVA, E.C.<sup>1</sup>; GOMES, R.G.<sup>1</sup>; RODRIGUES, D.M.<sup>1</sup>; TORRES, L. N.<sup>1</sup>; GUIMARÃES, M. B.<sup>2</sup>; DAVIES, Y. M.<sup>2</sup>; MATUSHIMA, E. R.<sup>1</sup>

1. Serviço de Patologia Animal – Hospital Veterinário (HOVET) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). 2. Ambulatório de Aves - Hospital Veterinário (HOVET) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

**Introdução:** as tumorações intracelomáticas em aves com etiologias diversas, tais como neoplasias, organomegalia, dilatações císticas e retenção de ovo (fêmeas) tendem a provocar marcante distensão abdominal. Os sinais clínicos associados são: letargia, perda da vocalização, hiporexia e dispneia. **Relato de caso:** um *Sporophila caerulescens*, popularmente conhecido como coleirinha, macho, de aproximadamente 15 anos de idade, foi encaminhado ao Ambulatório de Aves (HOVET FMVZ-USP) no dia 11/12/2013 com um quadro de hiporexia, aumento de volume abdominal e perda do empoleiramento, com evolução de 15 dias. O exame físico e radiográfico revelou presença de uma estrutura intracelomática compressiva de consistência firme - o animal veio a óbito antes da realização da laparotomia exploratória. A necropsia revelou a presença de uma tumoração intracelomática de formato arredondado e coloração amarelada, medindo aproximadamente 1,5 cm de diâmetro, em topografia de testículo esquerdo, deslocando todos os demais órgãos para a esquerda. A microscopia caracterizou a proliferação neoplásica testicular multilobulada, que ocupa a totalidade do parênquima, composta por células alongadas dispostas perpendicularmente a uma membrana basal (túbulos seminíferos) com abundante estroma fibrovascular hialinizado - as células neoplásicas apresentam moderada atipia celular com figuras de mitose infrequentes. A neoformação é histopatologicamente compatível com um sertolinoma. **Discussão:** as células de Sertoli são responsáveis pelo suporte das espermatogônias dentro dos túbulos seminíferos testiculares e também pela atividade de maturação e sincronização espermatogênica. O tumor das células de Sertoli (sertolinoma) é comum em cães e já foi descrito em bovinos, equinos, caprinos, felinos e diferentes espécies de aves, especialmente em periquitos-australianos. Essa neoplasia é descrita macroscopicamente como expansiva, arredondada a multilobulada, encapsulada, de coloração esbranquiçada (mamíferos) a amarelada (aves) – pode apresentar degeneração cística intralésional. Histologicamente são caracterizadas como proliferação de células alongadas, semelhantes às células de Sertoli normais – o arranjo se dá intraluminal aos túbulos seminíferos, onde as células organizam-se ao longo da membrana basal tubular. Variantes malignas podem ainda apresentar padrão infiltrativo e em aves tendem a ocupar a totalidade do parênquima testicular. **Conclusão:** Dentre as aves canoras silvestres, o coleirinha apresenta uma das maiores longevidades descritas (cerca de 30 anos), o que pode estar relacionado ao surgimento de neoplasias. A causa *mortis* do animal provavelmente foi consequência do efeito de compressão esplâncnica difusa pelo sertolinoma intracelomático, cujo tamanho têm significância clínica devido ao porte do animal.

### EFEITOS DA INIBIÇÃO DA MAGL E A PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES CANABINÓIDES CB1 E CB2 NA ATIVIDADE E NO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS EM UM MODELO MURINO DE INFLAMAÇÃO PULMONAR AGUDA

COSTOLA-DE-SOUZA, C.; CALEFI, A.S.; VITORETTI, L.B.; GEMENES-JÚNIOR, J.A.; GREIFFO, F.R.; FERRAZ-DE-PAULA, V.; RIBEIRO, A.; LIGEIRO-OLIVEIRA, A.P.; PALERMO-NETO, J.

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

A sinalização por endocanabinóides é finalizada por meio de hidrólise enzimática; um processo que para o endocanabinóide 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) é mediado pela lipase monoacilglicerol (MAGL). O JZL184 é um fármaco que apresenta alta seletividade na inibição da MAGL. Assim, o JZL184 aumenta os níveis de 2-AG que, por sua vez, atua sobre os receptores canabinóides CB1 e CB2 produzindo diversos efeitos como, por exemplo, o anti-inflamatório. A inflamação pulmonar aguda (ALI) e a sua forma mais grave, a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), em humanos, são doenças pulmonares, caracterizadas por infiltrado pulmonar bilateral com acúmulo de neutrófilos. A sepsé é a causa mais comum da ALI/SDRA; aproximadamente 40% de pacientes com sépsis, também apresentam ALI ou ARDS e a ALI/ARDS são síndromes graves associadas com mortalidade superior a 40%. Considerando-se que não há cura para a ARDS / ALI, foi utilizado um modelo murino de ALI para averiguar se a inibição da MAGL seria capaz de aliviar os sintomas inflamatórios ou, até mesmo, promover a cura do processo. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da inibição da MAGL (com o JZL184) na atividade e no recrutamento de neutrófilos em um modelo Murino de inflamação pulmonar aguda (ALI) induzida por LPS. Cinquenta camundongos C57Bl/6 machos fora utilizados (5-10 por grupo) e divididos em três grupos: veículo+salina, veículo+LPS e JZL184+LPS. Os animais foram tratados com JZL184 (16mg/kg) ou veículo pela via intraperitoneal (i.p.) e 60 minutos depois foi instilado LPS (100ug/ mL; 1uL/g) ou salina pela via intranasal. Seis, 24 e/ou 48 horas após a indução da ALI foram coletados o lavado bronco alveolar (BAL) e os pulmões dos camundongos para a análise das citocinas KC e MIP-2 e para análise da atividade de neutrófilos avaliada por MPO. Dada a observação de resultados anti-inflamatórios, foram administrados, 30 minutos antes do tratamento com o JZL184, os antagonistas de receptores CB1 ou CB2: o AM281 e o AM630, respectivamente (i.p. 2,5 e/ ou 5mg/kg). O LPS aumentou os níveis de KC, MIP-2 e MPO e o tratamento com o JZL184 preveniu tais alterações. O tratamento com os antagonistas de receptores CB1 e CB2 preveniram os efeitos anti-inflamatórios causados com o bloqueio da MAGL. Contudo o estabelecimento da ALI foi evidente 6, 24 e 48 horas após a indução da inflamação e foi constatado que o bloqueio da MAGL produziu efeitos anti-inflamatórios. Os receptores CB1 e CB2 mostraram-se conectados com os efeitos anti-inflamatórios do JZL184 no modelo murino de ALI. **Apoio financeiro:** FAPESP 2011/10181-7; 2009/51886-3.

## A EXPERIÊNCIA REPRODUTIVA PODE TORNAR UMA MÃE MAIS RESISTENTE À DOR? ASPECTOS MOLECULARES, FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS DA NOCICEPÇÃO EM RATAS: PAPEL DO RECEPTOR OPIÓIDE TIPO DELTA

CEZAR, L. C.<sup>1</sup>; VIDAL, R.<sup>2</sup>; CAMARINI, R.<sup>3</sup>; BERNARDI, M. .M.<sup>4</sup>; FELICIO, L. F.<sup>5</sup>; TEODOROV, E.<sup>6</sup>

1. Mestranda no Departamento de Patologia Experimental e Comparada - FMVZ/USP. 2. Bolsista de Treinamento Técnico no Centro de Matemática, Computação e Cognição – UFABC. 3. Livre docente no Departamento de Farmacologia - ICB/USP. 4. Professora e pesquisadora na Universidade Paulista- UNIP. 5. Livre docente no Departamento de Patologia Experimental e Comparada - FMVZ/USP. 6. Professora Adjunta II no Centro de Matemática, Computação e Cognição – UFABC.

**Introdução:** já se sabe que a maternidade torna as mães mais agressivas que seus limiares de dor parecem alcançar níveis muito altos, já podem se submeter a frio, calor e fome intensos desde que seus filhos nada sofram. Dessa maneira supõe-se que a mulher/fêmea tenha um *input* para ser maternal, particularmente quando há a presença do filho/prole e que exista um mecanismo analgésico endógeno ativado quando a fêmea encontra-se nessa situação. O surgimento e a manutenção do Comportamento Maternal são controlados pela interação de fatores ambientais, bioquímicos, hormonais e neurais. Os opióides estão intimamente ligados ao processo modulatório nociceptivo e quando ativados atuam por meio de receptores de subunidades mu, kappa e delta distribuídos pelo SNC, cuja ativação inibe a transmissão do estímulo nociceptivo aos centros superiores de processamento. O presente trabalho avaliou se a experiência reprodutiva pode modular aspectos moleculares e fisiológicos em ratas. **Métodos:** os animais, primeiramente acasalados ou não, utilizando-se grupos de dez animais por categoria: nulíparas, primíparas, múltiparas com duas gestações, múltiparas com três gestações, múltiparas com quatro gestações e múltiparas com cinco gestações. Ao 2º dia de lactação as ratas foram tratadas com uma injeção intraplantar de solução salina à 0,9% (até 1 ml/kg) ou carragenina (300ug/1000ul) sendo posteriormente realizada a avaliação de hiperalgesia por meio de analgesímetro digital (Von Frey). Na pata ipsilateral (esquerda) dos animais foi injetado carragenina e/ou salina, na pata contralateral (direita) nada foi injetado sendo assim o controle. Após decapitação as estruturas de interesse (estriado, PAG, hipotálamo) foram retiradas para as avaliações da expressão de Oprd1. **Resultados:** Ao analisar os dados do Von Frey, as ratas nulíparas, primíparas, múltiparas duas, múltiparas três, múltiparas quatro e múltiparas cinco apresentaram queda significativa no limiar de resposta nociceptiva, sendo evidente no pico da 3ª hora pós-injeção. Na avaliação da expressão de Oprd1 observou-se aumento significativo na expressão do gene quando ratas foram tratadas com carragenina nos grupos múltiparas com duas e cinco gestações somente no estriado, evidenciando a participação de receptores opióides em circuitos de modulação da dor. **Conclusão:** ficou evidente que as ratas de 5ª gestação apresentam um limiar nociceptivo diferente dos demais grupos e que sentem muito menos ao estímulo hiperalgésico mecânico. Deixando claro que a experiência reprodutiva pode interferir diretamente na percepção nociceptiva. Além da ação de esteroides sobre receptores opióides e modulação da nocicepção, a inflamação causada pela carragenina também teria papel importante sobre receptores opióides.

## MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO LACRIMAL, SENSIBILIDADE CORNEANA E PRESSÃO INTRAOCULAR EM *PSITTACARA LEUCOPHTALMUS*

CESCHIN, A.<sup>1</sup>; DONGO, P.J.<sup>1</sup>; GUIMARÃES, M.B.<sup>2</sup>; EYHERABIDE, A.R.<sup>1</sup>; RODRIGUEZ, E.A.K.<sup>1</sup>; MILANELO, L.<sup>3</sup>; SAFATLE, A.M.V.<sup>1</sup>; BOLZAN, A.A.<sup>1</sup>

1. Laboratório de Investigação em Oftalmologia Comparada (LIOC) do Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP. 2. Departamento de Patologia da FMVZ/USP. 3. Parque Ecológico do Tietê (DAEE), São Paulo, SP.

**Introdução e objetivo:** o periquitão maracanã ou maritaca (*Psittacara leucophthalmus*) é uma espécie aviária distribuída geograficamente por todo o país, principalmente na região sudeste. A prevalência de doenças oculares em aves está situada na faixa de 8 até 26% e a sua casuística na rotina oftálmica tem sido frequente. Relatos quanto à anatomia e fisiologia do olho e de seus anexos, em maritacas, são inexistentes até o presente e essenciais para o diagnóstico e tratamento de oftalmopatias. A córnea, parte transparente da túnica fibrosa do bulbo ocular é o tecido mais densamente innervado e sensível do organismo, ricamente suprido por fibras nervosas sensoriais e autonômicas. A produção lacrimal é fundamental para a manutenção da integridade corneana, podendo ser aferida em sua porção aquosa, pelos testes lacrimais de Schirmer (TLS) e de fenol vermelho (TFV). A investigação da sensibilidade da córnea (SC) tem sido investigada com o uso de estesiômetros como o de Cochet-Bonnet. A pressão intraocular (PIO) é mantida pelo equilíbrio entre a produção e drenagem do humor aquoso e pode ser avaliada por meio de tonometria por aplanção, que é um método não invasivo, simples e rápido, com mínimo desconforto para o paciente. O presente trabalho foi delineado para estabelecer os valores de normalidade referentes a estes parâmetros para esta espécie. **Material e métodos:** nove periquitões maracanã (17 olhos), adultos, de sexo indeterminado, do Parque Ecológico do Tietê (DAEE), foram submetidos à avaliação oftálmica, na seguinte sequência: mensuração lacrimal com TFV (Zone-Quick®) e TLS modificado (3mm) (Ophthalmos®), SC com o estesiômetro de Cochet-Bonnet (Lunneau®) e mensuração da PIO por aplanção (TonoPen Avia®) após instilação de colírio anestésico de cloridrato de proximetacaína 0,1%. Os animais não apresentavam sinais aparentes de lesões oftálmicas e foram contidos manualmente sem o uso de fármacos anestésicos. **Resultados e discussão:** Os valores de média e desvio padrão respectivamente, para o TFV foram 8,0±4,5mm, TLS 4,0±2,5mm, estesiometria 2,5±0,4cm e PIO 12,0±2,5mmHg. Os valores relativos ao TFV mostraram-se inferiores aos encontrados na literatura para outros psitacídeos; quanto ao TLS, os valores foram semelhantes aos já reportados. Este é o primeiro relato sobre tais testes nesta espécie. Poucos estudos referem valores de 15 e 20 a 25mmHg, à tonometria de aplanção, sendo similares ou superiores aos obtidos, respectivamente. Não foram encontrados dados quanto à estesiometria, em Psitacíformes, portanto os valores não puderam ser comparados. **Conclusão:** os valores de produção lacrimal, sensibilidade corneana e mensuração da pressão intraocular foram estabelecidos e padronizados para a espécie *Psittacara leucophthalmus* e ficam disponibilizados como referência para a avaliação oftálmica destas aves.

## ENTERITE EM FRANGOS POR PARVOVÍRUS DE ORIGEM AVIÁRIA

NUÑEZ, L.F.N. SANTANDER-PARRA, S.H. ASTOLFI-FERREIRA, C.S. FERREIRA, A.J.P.

Laboratório de Ornitopatologia; Departamento de Patologia; Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; Universidade de São Paulo – Brasil

**Introdução:** O parvovírus de galinha (ChPV) é um DNA vírus que tem sido relacionado em avicultura com problemas entéricos, principalmente com a síndrome do nanismo e retardo do crescimento. A doença causa grandes perdas econômicas na avicultura pela diminuição do ganho de peso, queda na conversão alimentar e mortalidade. O presente trabalho investigou se o ChPV desenvolve doença entérica em aves infectadas experimentalmente.

**Métodos:** aves SPF foram inoculadas com a suspensão viral de ChPV isolado em ovos embrionados de galinha. Foram inoculadas 35 aves com a suspensão viral de ChPV e 35 pintinhos SPF foram mantidos como controle não inoculados, no primeiro dia de idade. As aves foram mantidas em isoladores por 42 dias com água e ração ad-libitum. A cada sete dias, cinco aves foram sacrificadas para obtenção do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) para o exame histopatológico. Também, foram avaliados os sinais clínicos das aves após a inoculação. **Resultados:** doze horas após a inoculação as aves apresentavam, apatia, sonolência, penas eriçadas, empastamento cloacal e diarreia profusa, condição que se manteve até o final do experimento. O grupo controle não inoculado não apresentou qualquer sinal clínico. No 14º dia da inoculação foi constatada a presença de desuniformidade e nanismo, no lote. A análise macroscópica mostrou que o intestino delgado estava distendido, com presença de gases e conteúdo líquido. A alça duodenal apresentava-se com enrolamento em forma de “J”. Ao longo do intestino, observou-se segmentação e presença hemorragia petequial intensa. As alças intestinais apresentavam-se delgadas e repletas de líquido e com aspecto gasoso. Cecos apresentavam-se distendidos. Foi detectada a retenção do saco da gema. O pâncreas apresentava petéquias e marcada atrofia, principalmente do lóbulo distal. O fígado apresentava um padrão reticular em toda sua extensão. O proventrículo, ventrículo, moela, timo, baço, bursa e rins não apresentavam alterações dignas de nota. As lesões descritas foram encontradas do 7º ao 42º dia da investigação. **Conclusão:** as aves do grupo controle negativo não apresentaram nenhuma das alterações descritas. O ChPV apresenta tropismo para os órgãos do sistema digestivo e glândulas anexas, como pâncreas. O estudo mostra a importância do ChPV como agente etiológico de enterites em galinhas. **Apoio financeiro:** CAPES, CNPq.

## RANGELIOSE EM CÃO DOMÉSTICO (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*): UMA DOENÇA EMERGENTE

SILVA, E.C. TORRES, L. N. CORRÊA, S.V.M. LACERDA, A.M.D. GOMES, R.G. RODRIGUES, D.M. GUERRA, J.M. SOARES, J.F. LABRUNA, M.B. SÁ, L.R.M. COGLIATI, B.

1. Serviço de Patologia Animal – Hospital Veterinário (HOVET) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). 2. Clínica Médica de Pequenos Animais – Hospital Veterinário (HOVET) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). 3. Instituto Adolfo Lutz (IAL) - Centro de Patologia, Brasil. 4. Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal – Hospital Veterinário (HOVET) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

**Introdução:** a rangeliose é uma moléstia infecciosa causada por um piroplasma (*Rangelia vitalii*), transmitido pelo carrapato *Amblyomma aureolatum*, que acomete cães em áreas de Mata Atlântica e Campos Sulinos. A doença foi descrita em 1908, como Nambyuvú, termo tupi-guarani que significa “orelhas que sangram”, um sinal clínico clássico em animais infectados agudamente. Apesar de antiga, permaneceu esquecida durante boa parte do século 20, sendo considerada sinônimo de babesiose, mesmo apresentando formas extra-eritrocitárias. Em 2011, alguns genes do parasito foram sequenciados, revalidando-se a espécie *R. vitalii*, no entanto a doença continua subdiagnosticada. O presente trabalho descreve um caso de rangeliose em um cão destacando a importância do diagnóstico clínico, laboratorial e anatomopatológico. **Relato de Caso:** um canino, fêmea, SRD de sete anos de idade foi conduzido ao HOVET/FMVZ-USP com prostração, anorexia, êmese, melena e colúria há uma semana. Vivía em uma chácara em Mairiporã (SP) e apresentava contato com ratos e histórico de ixodidiose. Ao exame físico, constatou-se apatia, mucosas ictéricas, petéquias, desidratação e esplenomegalia, confirmada em exame de imagem. Os exames laboratoriais indicaram anemia, trombocitopenia, monocitose, azotemia, hiperbilirrubinemia e hipoproteinemia. Apesar do tratamento de suporte, o animal foi a óbito em 36 horas e foi realizada necropsia completa. Macroscopicamente foi observado esplenomegalia, icterícia, petéquias e hemorragia intestinal. Microscopicamente, foram observados no endotélio vascular e no interior de macrófagos do pulmão, coração, baço, fígado e rins a presença de merozoítos e merontes sugestivos de *R. vitalii*, por vezes associados a uma resposta inflamatória mononuclear. Os exames imunohistoquímicos foram negativos para *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*. Os exames moleculares de reação em cadeia da polimerase (PCR) foram positivos para *R. vitalii* e negativos para *Ehrlichia canis* e *Babesia* spp. **Discussão:** a *R. vitalii* provoca intensa vasculite, recrutando grande número de plaquetas, que ainda sofrem sequestro em baço e fígado. Assim, a trombocitopenia é o achado laboratorial mais relacionado à doença, podendo ou não ser acompanhada de anemia por hemólise e hemorragia. O diagnóstico, *in vivo*, na ausência de técnicas moleculares, deve ser firmado pela associação da trombocitopenia com a epidemiologia distinta desta hemoparasitose, juntamente com os sinais clínicos de diarreia sanguinolenta e, ocasionalmente, icterícia. **Conclusão:** o diagnóstico de rangeliose no cão se baseou em trombocitopenia, diarreia e icterícia associados à identificação de merozoítos e merontes de *R. vitalii* nos diferentes órgãos, o que enfatiza a importância da associação clínica, laboratorial e anatomopatológica.

## IDENTIFICAÇÃO DE CARBOFURANO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A UM DETECTOR DE ARRANJO DE DIODOS (CLAE-DAD) EM MATRIZ BIOLÓGICA DE CÃES E GATOS (PROJETO EM ANDAMENTO)

GONÇALVES, V.J.<sup>1</sup>; BASTOS, S.<sup>2</sup>; SIQUEIRA, A.<sup>1</sup>; HAZARBASSANOV, N.Q.<sup>3</sup>; FLORIO, J.C.<sup>3</sup>; FUKUSHIMA, A.R.<sup>1</sup>; MAIORKA, P.C.<sup>4</sup>; SPINOSA, H.S.<sup>4</sup>.

1. Estudante de Pós-Graduação - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
2. Graduanda - Faculdade de Farmácia - Universidade São Judas.
3. Especialista de Laboratório - Departamento de Patologia-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
4. Professor - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** O carbofurano (2,3-di-hidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) é um praguicida da classe dos carbamatos utilizado como inseticida e nematicida em agricultura. Devido as suas semelhanças químicas com o aldicarbe, também tem sido associado com o envenenamento intencional. A toxicidade em relação aos mamíferos é relativamente alta (DL50 oral, 8-11 mg / kg em ratos) e é muito tóxico para os invertebrados, peixes e aves, e deve ser tratado com cautela para evitar a contaminação ambiental ou exposição acidental. O presente trabalho empregou a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), carbofurano em matrizes biológicas animal com finalidade forense. Doze amostras foram analisadas por CLAE-DAD, utilizando-se o Solutions Chromatograph Agilent 1100 visando otimizar as técnicas de preparação de amostras. **Resultados parciais:** O método para separação cromatográfica foi desenvolvido utilizando-se um gradiente de fase móvel constituída por água: acetonitrila, produzindo uma separação adequada dos analitos com resolução suficiente, tanto para identificação quanto quantificação de compostos. No período de 01/2014 a 06/2014, recebemos doze amostras de conteúdo estomacal e / ou fígado de seis cães e seis gatos do Serviço de Patologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Desses, 58% foram positivos para carbofurano. A seleção foi baseada no relatório de necropsia da suspeita de envenenamento por carbamatos. **Conclusão parcial:** A metodologia mostrou-se adequada para a identificação de carbofurano.

## DETECÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ELEMENTOS ESSENCIAIS E METAIS ENCONTRADOS NO SANGUE DE TARTARUGAS VERDES (*CHELONIA MYDAS*) JUVENIS CAPTURADAS NA COSTA BRASILEIRA (PROJETO EM ANDAMENTO)

PRIOSTE, F.E.S.<sup>1</sup>; ROSSI, S.<sup>1</sup>; GATTAMORTA, M.A.<sup>1</sup>, SOUZA, V.C.O.<sup>2</sup>; QUEIROZ, M.R.<sup>3</sup>; BARBOSA JR, F.<sup>2</sup>; MATUSHIMA, E.R.<sup>1</sup>

1. Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens– LAPCOM da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
2. Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP – USP.
3. Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística – LEB da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução:** As tartarugas verdes (*Chelonia mydas*) são quelônios marinhos encontrados em pelo menos 139 países e considerados em perigo pela International Union for Conservation of Nature –IUCN. O declínio das populações de tais animais tem sido atribuído ao desenvolvimento costeiro, captura incidental pela pesca, uso direto para consumo humano, mudanças climáticas, poluição e patógenos. A fibropapilomatose é uma doença neoplásica caracterizada por único ou múltiplos crescimentos fibroepiteliais cutâneos, com superfície verrucosa ou lisa que tem afetado as populações de tartarugas verdes nos últimos anos. O presente trabalho determinou a concentração de 20 elementos químicos no sangue de tartarugas verdes capturadas na costa brasileira, quantificando as suas concentrações e verificando a existência de uma possível relação com a presença da fibropapilomatose. **Material e métodos:** os espécimes foram capturados em parceria com o Projeto TAMAR/ICMBio, colhendo-se 1mL de sangue do seio venoso cervical, que foi acondicionado em tubos Vacuette® Trace Elements Sodium Heparin. As análises foram realizadas por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplada – ICP-MS e o gerenciamento do banco de dados e a análise estatística utilizaram o software R (R Development Core Team, 2013).

**Resultados e discussão:** Os resultados preliminares de 31 amostras de tartarugas verdes capturadas em Fernando de Noronha-PE, expressos em médias (desvio-padrão)(ng.g-1) foram: Al- 96,24(59,36); Se-424,63(504,90); Zn-14050,54 (10337,35); Ca-79691,53 (29648,28); As-366,79 (316,74); Pb-27,13 (15,14); Cd-14,37 (12,35); Mn-61,14 (88,92); Co-51,50 (36,64); Cu-757,04 (207,07), Li-33,10 (7,33); Cs-0,81 (0,18); Ba-3,67 (1,75); Rb-1118,58 (293,64), U-0,36 (0,22); Te-0,15 (0,19); Be-1,05 (0,43); Mo-19,43 (49,58); Sb-5,92 (4,25) e Te-0,32 (0,16). Pelo fato de Fernando de Noronha ser área livre da fibropapilomatose, estes resultados serão considerados basais para a análise estatística a ser realizada em relação as demais localidades: Almofala – CE; Vitória – ES e Ubatuba – SP, cuja prevalência da doença é de 36,94%; 21,2% e 10,73%, respectivamente. Os resultados a serem obtidos permitirão uma melhor compreensão da fibropapilomatose nas tartarugas marinhas e contribuirão para conservação da espécie e para o estabelecimento de uma política de proteção das águas continentais brasileiras. **Apoio financeiro e agradecimentos:** Os autores agradecem ao Projeto TAMAR/ICMBio e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP, pelo apoio e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Processo 2012/14319-6 e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

## IMUNOMARCAÇÃO DE APAF-1 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS (PROJETO EM ANDAMENTO)

BARRA, C.<sup>1,2</sup>; PULZ, L.<sup>1</sup>; STREFEZZI, R.F.<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2. Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP. Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP.

**Introdução e objetivos:** os mastocitomas representam aproximadamente 25% de todas as neoplasias malignas cutâneas em cães. O aspecto macroscópico e o comportamento extremamente variável destes tumores dificultam a elaboração de um prognóstico preciso e inclusive a prescrição de tratamentos específicos. Sabe-se que o processo de apoptose é um tema indispensável em oncologia por sua importância no desenvolvimento tumoral e metastatização. Alterações nesse mecanismo favorecem a progressão tumoral, pois permitem a sobrevivência das células neoplásicas na circulação e outros microambientes. As proteínas que participam da via intrínseca da apoptose são indispensáveis nesse processo, como a proteína APAF-1 (fator apoptótico de ativação de protease 1) que se liga à citocromo C liberada pela mitocôndria formando um complexo proteico denominado apoptossomo. Tal complexo contém na sua porção N terminal um domínio de recrutamento de caspases (CARD), que é responsável pela interação com a caspase 9. Uma vez ativada, segue-se o processo que culmina em morte celular. Pela importância desta via apoptótica na progressão tumoral e na morte celular induzida por grande parte dos antineoplásicos utilizados atualmente, as proteínas associadas a apoptose podem ser importantes marcadores prognósticos e preditivos em diversos tumores. O presente trabalho caracterizará a expressão imuno-histoquímica da APAF-1 em mastocitomas cutâneos canino procurando verificar o seu potencial para marcador prognóstico nesta neoplasia. **Materiais e métodos:** cinquenta casos de mastocitomas cutâneos caninos serão processados para histologia de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina. Os cortes histológicos obtidos serão corados pela hematoxilina e eosina para gradação das lesões, e utilizados para processamento imuno-histoquímico. O processamento imuno-histoquímico será realizado com anticorpo primário anti-APAF-1 (Santa Cruz, SC-7231), na diluição 1:100, de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle negativo, SERÁ utilizado IgG de camundongo em substituição ao anticorpo primário. A quantificação das marcações será determinada pela porcentagem de células positivas em cinco campos de marcação intensa ("hot spots"). Os resultados serão comparados à gradação histopatológica, mortalidade em função do tumor e sobrevida.

**Resultados:** Até o presente foi observada a existência da expressão citoplasmática em número variável de mastócitos neoplásicos por lesão, com padrão finamente granular. Novas amostras estão sendo processadas para a validação do protocolo e ampliação do número de casos analisados, de modo a viabilizar a quantificação das marcações e a realização da análise estatística.

**Apoio financeiro:** FAPESP (processo 2013/13252-8); CAPES.

## CORRELAÇÃO ENTRE AS MALFORMAÇÕES DE VIPERÍDEO NEOTROPICAL E O PADRÃO DE USO DO SOLO NO SUDESTE BRASILEIRO

SANT'ANNA, S.S.<sup>1,2</sup>; GREGO, K.F.<sup>2</sup>; RAMOS-NETO, M.B.<sup>3</sup>; CARVALHO, M.<sup>1</sup>; CATÃO-DIAS, J.L.<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia Experimental da FMVZ-USP; 2. Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, 3. Laboratório de Ecologia da Paisagem – WWF-Brasil

**Introdução:** as espécies de répteis têm sofrido um declínio global, sendo que as razões para esse fenômeno muitas vezes tem relação com as ações antropogênicas. Perda ou degradação do habitat e poluição ambiental estão entre as principais causas para este declínio. O presente trabalho pesquisou a existência de correlação entre o padrão de uso do solo e malformações no viperídeo neotropicais, *Bothrops jararaca*, conhecida popularmente como jararaca. **Métodos:** malformações em filhotes desta espécie nascidos em cativeiro no Instituto Butantan (IB), mas de mães recém-capturadas na natureza, foram correlacionadas com o padrão de uso do solo (urbanização, agricultura, pecuária e vegetação nativa) por município, utilizando-se o Coeficiente de Spearman. Para que a amostragem fosse representativa da população dos municípios, foram utilizados apenas municípios que enviaram sete ou mais fêmeas prenhes ao IB (acima 100 filhotes por município). **Resultados:** o registro de malformações em *B. jararaca* apresentou correlação positiva com as áreas agrícolas ( $rs = 0,67$ ;  $p = 0,01$ ). Municípios com maiores áreas percentuais de atividade agrícola apresentaram um maior número de filhotes com malformações. Por outro lado, houve uma correlação negativa quanto às áreas de vegetação nativa ( $rs = -0,57$ ;  $p = 0,03$ ). Neste caso os municípios com maiores áreas percentuais de áreas nativas apresentaram os menores índices de filhotes com malformações. Não houve correlação entre a pecuária ou urbanização e malformações em jararaca. **Conclusão:** Os fatores que podem estar influenciando o maior índice de malformações em áreas com percentagens maiores de agricultura não são conhecidos, entretanto diversas substâncias utilizadas na agricultura tais como defensivos agrícolas e fertilizantes tem ação teratogênica. Este estudo, a nosso ver, contribui significativamente para a discussão da influência antropogênica sobre a fauna de vertebrados terrestres no Brasil no que tange à sua relação com a agropecuária, abrindo perspectivas para pesquisas futuras. **Apoio Financeiro:** INCTTOX.

## DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS GLICÊMICOS EM SAGUIS (*CALLITHRIX SP.*): UMA SUGESTÃO RÁPIDA E EFICIENTE PARA AVALIAÇÃO DA SANIDADE DOS CALITRIQUÍDEOS

CARVALHO, L.; PRIOSTE, F.E.S.; MATUSHIMA, E.R.

Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens– LAPCOM da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Estima-se que a cada dia uma espécie animal ou vegetal é extinta no mundo, seja pela perda de seu habitat, alterações climáticas, introdução de fauna exótica ou tráfico ilegal. Dentre os animais ameaçados é destacam-se os primatas do novo mundo. No Brasil, 30% dos primatas estão ameaçados de extinção, principalmente devido à perda de seu habitat. Comprovando esta realidade, constata-se que os animais do gênero *Callithrix* ocupam a segunda posição na lista dos mamíferos mais apreendidos nos Centros de Triagem de Animais Silvestres do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Como resultado do tráfico ilegal destes animais, muitos apresentam sinais clássicos de desidratação, subnutrição, ferimentos

e traumatismos. Porém, poucas informações são conhecidas sobre a sua fisiologia e enfermidades, o que dificulta a avaliação de sua sanidade. Um parâmetro ainda pouco explorado e que permite a avaliação do estado de saúde dos animais apreendidos é a glicemia, que apresenta resultados rápidos e é obtida com procedimentos de baixo custo, sensíveis e por métodos pouco invasivos. Os primatas não humanos são susceptíveis a uma série de doenças que causam distúrbios no metabolismo da glicose, que poderiam ser identificados por essa metodologia, como a diabetes mellitus, hipertireoidismo, hiperadrenocorticismo, hiperpituitarismo, pancreatite, insuficiência hepática e lesões no sistema nervoso central. Neste trabalho foram avaliados 70 animais das espécies *Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata* e híbridos mantidos em Criadouro Comercial na Grande São Paulo. Os animais estavam em jejum de quatro horas e as coletas foram realizadas no período da manhã. As amostras foram obtidas por meio da punção da veia femoral com seringas de 1mL (BD®) e agulhas 30G (0,30mm) e com leve compressão posterior do local, para evitar a formação de hematomas. A glicemia foi determinada colocando-se uma gota de sangue na tira do aparelho portátil para leitura de glicose Accucheck® Active (Roche) de uso humano. A média obtida na população em estudo foi de 127,5mg/dL, com desvio padrão de 39,58mg/dL (Anderson-Darling,  $p > 0,005$ ). Comparando-se os gêneros, as fêmeas (N=7) apresentaram uma média de 114,6mg/dL com desvio padrão de 22,7mg/dL e os machos (N=17) uma média de 132,9mg/dL e desvio padrão de 44,2mg/dL (Teste “t”). Os resultados obtidos no presente trabalho poderão contribuir tanto para a avaliação dos animais apreendidos, quanto para os programas de reabilitação e soltura de animais provenientes do tráfico, avaliação de animais *ex situ* e *in situ* e programas de conservação. **Apoio financeiro:** FAPESP (processo 2013/07780-1).

## ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNO-HISTOQUÍMICOS DA INFECÇÃO PELO HERPESVÍRUS BOVINO TIPO 5 (BOHV-5) NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS BALB/C

MESQUITA, L.P.<sup>1</sup>; TONIETTI, P.O.<sup>2</sup>; FUSUMA, M. M.<sup>2</sup>; PITUCO, E.M.; MORI, E.<sup>1,3</sup>; MORI, C.M.C.<sup>1</sup>; MAIORCA, P.C.<sup>1</sup>

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo. 2. Laboratório de Vírus de Bovídeos, Instituto Biológico, São Paulo. 3. Instituto Pasteur, São Paulo.

**Introdução e objetivos:** o herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5) é um importante agente infeccioso responsável por causar meningoencefalite em bovinos jovens. O BoHV-5 induz infecções no sistema nervoso central (SNC) de camundongos, especialmente naqueles com deficiências genéticas, que tem sido utilizados como modelos experimentais. Entretanto, pouco se sabe a respeito da patogênese da infecção em camundongos com o sistema imune intacto. Portanto, o presente trabalho avaliou as lesões histológicas e a distribuição antigênica viral no sistema nervoso central de camundongos BALB/c (H2d) infectados pelo vírus BoHV-5. **Material e métodos:** 54 camundongos BALB/c, fêmeas, com três semanas de idade foram utilizados, dos quais 27 foram inoculados com 20µL de suspensão viral contendo o BoHV-5 com título de 108,0 DICT<sub>50</sub>/mL, por via intracraniana, sob anestesia inalatória com sevoflurano. Os 27 animais do grupo controle foram tratados de forma idêntica aos experimentais e receberam 20µL de EMEM. Três camundongos de cada grupo foram eutanasiados por overdose de sevoflurano, nos dias 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15 e 20 após inoculação (dpi). O encéfalo foi coletado e processado para histologia. Seções de 5µm também foram submetidas à imuno-histoquímica (IHQ) para detecção de antígenos virais de BoHV-5 com anticorpo primário monoclonal (cedido pelo prof. Rudi Weiblen). **Resultados:** Nos

camundongos inoculados com BoHV-5, foram visualizadas lesões histológicas até o 10ºdpi. As lesões localizavam-se principalmente no diencéfalo caudal e eram caracterizadas por espongiase focalmente extensa com áreas liquefeitas (necrose de liquefação) do neurópilo, associada à grande quantidade de células da glia (gliose) e a uma menor quantidade de linfócitos, macrófagos e raros neutrófilos. No 4º e 5º dpi, na periferia e associado à área de inoculação, foram visualizados manguitos perivascularares, compostos por uma a três fileiras de linfócitos, macrófagos e plasmócitos. Periventriculite e meningite, composta por macrófagos, linfócitos, plasmócitos e neutrófilos também foram visualizadas de forma mais acentuadas no 5º dpi. Na IHQ, antígenos de BoHV-5 foram detectados em todos os camundongos inoculados com o vírus. A marcação foi mais intensa nos dias 3, 4, 5, 6 e 7 pós-inoculação. Os antígenos virais foram visualizados no neurópilo, em citoplasma de neurônios, células inflamatórias e células da glia. As marcações para BoHV-5 também estavam presentes no citoplasma de macrófagos, nas áreas de periventriculite e meningite. **Conclusão:** O presente estudo demonstrou que o BoHV-5 pode causar lesões no SNC em camundongos BALB/c, e que antígenos virais estavam presentes em células do SNC e células inflamatórias, principalmente macrófagos. **Apoio:** FAPESP.

## EFEITO DA SEPARAÇÃO MATERNA SOBRE O COMPORTAMENTO DEPRESSIVO E O DESENVOLVIMENTO DO TUMOR EHRLICH EM CAMUNDONGOS

FERNANDES, K. R.<sup>1</sup>; NETO, E. B.<sup>1</sup>; FREITAS, T. A.<sup>1</sup>; KLEEB, S. R.<sup>1</sup>

1. Núcleo de Pesquisa – Universidade Metodista de São Paulo.

A depressão tem sido associada a alterações neuroquímicas e neuroplásticas em mediação neuroendócrina via eixo hipotálamo-Hipófise-Adrenal. Há a hipótese que além das alterações neuroquímicas, a depressão possa surgir a partir de alterações neuroplásticas. O presente trabalho investigou o efeito do estresse desencadeado na separação materna sobre a gênese da depressão e o desenvolvimento do tumor de Ehrlich. Os procedimentos foram aprovados pelo CEUA-Metodista sob protocolo 121/14. Foram utilizados 18 casais de camundongos da linhagem Swiss, provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisa da FacSaúde /UMESP. As ninhadas foram padronizadas com no máximo oito machos, que foram monitorados e pesados diariamente. No grupo experimental (E), do 3º ao 12º dia após o nascimento os filhotes foram separados da mãe por três horas diárias, em temperatura controlada, após este período foram recolocados com a mãe. No grupo controle (C) os animais foram mantidos com a mãe. Os animais foram avaliados no teste de natação forçada (NF) e campo aberto (CA). Para a inoculação os grupos foram subdivididos: metade do grupo controle (CT) e metade do grupo experimental (ET) receberam 0,1ml de suspensão do tumor de Ehrlich, e a outra metade de ambos os grupos controle (CPBS) e experimental (EPBS) receberam solução salina tamponada. Na avaliação do peso corporal houve diferença significativa individualmente do 3º dia de vida grupo C (4,022 ± 0,08085) E (3,634 ± 0,1466) ao 11º dia de vida grupo C (9,157 ± 0,2550) E (8,280 ± 0,1565). Após a inoculação do tumor Ehrlich houve significância CPBS (39,32 ± 0,2244) CT (40,92 ± 0,2932) EPBS (40,78 ± 0,2974) e ET (38,27 ± 0,3367). A diferença apresentada foi entre as médias dos grupos CPBS vs CT; CPBS vs EPBS; CT vs ET; EPBS vs ET. Na avaliação pré inoculação do Tumor Ehrlich foi constatada a imobilidade do NF C (75,41 ± 9,16) E (75,00 ± 10,88) e locomoção do CA C (152,9 ± 7,908) E (173,0 ± 8,680), ambos resultados sem diferença significativa. Após vinte e um dias de evolução da neoplasia, os animais foram avaliados novamente nos testes comportamentais, na locomoção do CA CPBS (122,3 ± 10,86) CT (138,4 ± 13,04) EPBS (97,44 ± 10,53) ET (146,4 ± 11,35). Na avaliação da imobilidade em NF não

houve diferença, porém os animais provenientes do grupo sem separação pareceram ficar mais tempo imóveis CPBS ( $51,83 \pm 11,12$ ) CT ( $44,25 \pm 12,13$ ) EPBS ( $29,67 \pm 7,796$ ) ET ( $30,92 \pm 13,36$ ). A massa neoplásica foi retirada para avaliação macroscópica entre os grupos ET ( $19,70 \pm 4,203$ ) CT ( $21,42 \pm 9,416$ ) e não apresentou diferença estatística. Os dados em conjunto sugerem que a separação materna não determinou alterações comportamentais. Entretanto na presença da massa neoplásica os animais que sofreram a separação materna desenvolveram tendência a um distúrbio de ansiedade.

## HISTOPATOLOGIA DAS NEFROPATIAS EM PEQUENOS CETÁCEOS DO ESPÍRITO SANTO/BRASIL

SANTOS-COSTA, P.C.<sup>1</sup>, SILVEIRA, L.S.<sup>1</sup>, BARBOSA, L.A.<sup>2</sup>

1. Laboratório de Morfologia e Patologia Animal, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ/Brasil. 2. Instituto Consciência Ambiental (ORCA), Vila Velha, ES/Brasil.

Os rins de mamíferos desempenham um importante papel na manutenção da homeostasia, especialmente nos mamíferos marinhos frente às adaptações fisiológicas ao ambiente marinho. O presente trabalho investigou as principais lesões encontradas em amostras renais de pequenos cetáceos encalhados no litoral do Espírito Santo, Brasil. Foram examinadas amostras provenientes de nove indivíduos encontrados encalhados já mortos em praias do litoral do Espírito Santo ou que vieram a óbito durante o processo de reabilitação na Organização Consciência Ambiental – Instituto ORCA. As amostras foram submetidas ao método convencional de preparação de lâminas histológicas. Nove diferentes espécies foram examinadas: o boto-cinza (*Sotalia guianensis*) foi a mais frequente, 33,3% (3/9) dos casos. Os principais achados histopatológicos foram relacionados a processos hemodinâmicos e infecciosos como congestão (66,6%) e hemorragia (22,2%) e glomerulonefrite membranosa (33,3%) e nefrite intersticial (11,1%), respectivamente. Cistos simples como os encontrados em uma amostra deste estudo já foram descritos em golfinhos, sem evidência de lesões obstrutivas, e foram considerados anomalias de desenvolvimento. Achados como a mineralização encontrada em 22,2% das amostras são comumente relacionados a distúrbios no metabolismo de cálcio ou à deposição de sais minerais em tecidos submetidos a lesões degenerativas ou inflamatórias. Já a esteatose observada em 11,1% dos casos pode estar relacionada a lesões em outros órgãos, como o fígado, caracterizando uma síndrome passível de injúrias letais, porém, as causas dessa e das outras lesões seriam mais bem entendidas com um estudo completo abrangendo a macroscopia e avaliação de outros tecidos, assim como a história clínica e/ou do encalhe. Entretanto, é muito provável que estas lesões tenham contribuído com a piora do quadro clínico do animal e conseqüentemente com o seu encalhe na praia. Esses resultados reforçam a importância de uma maior compreensão dos processos patológicos que acometem e predis põem os cetáceos à morte, bem como a necessidade de uma abordagem multidisciplinar dos animais encalhados na busca do conhecimento necessário para direcionar os esforços na conservação das diferentes espécies. **Apoio financeiro:** CNPq.

## HEPATITE ASSOCIADA AO VÍRUS DA LARINGOTRAQUEITE INFECCIOSA EM EMBRIÕES DE GALINHA

SANTANDER PARRA, S. H.; NÚÑEZ, L. F. N.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; PIANTINO, A. J. F.

Laboratório de Ornitopatologia, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** a laringotraqueite infecciosa (LTI) é uma doença respiratória altamente contagiosa e pertence à lista de doenças de notificação obrigatória de animais terrestres da OIE. Este vírus causa severas perdas econômicas devido à mortalidade, diminuição da produção de ovos, perda de peso e predisposição a infecções com outros patógenos aviários. Nos materiais de campo o vírus pode ser isolado em embriões de galinhas livres de patógenos específicos (SPF), ou pelo isolamento em células de rim de embrião de galinha (CEK), dentre outros. O presente trabalho descreve as lesões microscópicas causadas pelo vírus da LTI no fígado e na membrana coriolantóide (MCA) de embriões de galinha inoculados experimentalmente. **Métodos:** as amostras (344-4 e 377-16) foram inoculadas em cinco ovos embrionados de galinha SPF, com dez dias de incubação e mantidos até o dia 15. Foi realizada a necropsia dos embriões, o fígado e a MCA foram colhidos tanto para os testes moleculares quanto para a análise histopatológica. **Resultados:** na análise macroscópica, os fígados apresentavam-se esverdeados e com manchas esbranquiçadas, já na análise microscópica, apresentavam-se com degeneração vacuolar no citoplasma, com vacúolos de diferentes tamanhos (5/5). Os hepatócitos apresentavam ausência de citoplasma e zonas de necrose (5/5). Observou-se moderado número de células de Kupffer, presença de infiltrado de heterófilos entre os sinusóides próximos da veia centro lobular e o espaço porta. Observou-se infiltrado de linfócitos próximo aos vasos sanguíneos adjacentes à vesícula biliar (5/5). A cápsula de Glisson e a vesícula biliar não apresentaram alterações microscópicas. A MCA apresentou infiltrado de células polimorfonucleares, congestão e infiltrado de linfocítico (5/5). Na literatura são descritas alterações na MCA quando houve isolamento do vírus da LTI e onde este também foi detectado por PCR, porém não foram descritas alterações em outros órgãos do embrião. No presente trabalho, a hepatite multifocal aguda foi associada à detecção do vírus no fígado dos embriões. **Conclusão:** o vírus da LTI pode multiplicar-se no fígado, provocando hepatite. O órgão pode ser considerado de eleição para o isolamento do agente. **Apoio financeiro:** CNPq.

## CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NOS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS EM CÃES NO AMBIENTE DE BANHO E TOSA

NAKAMURA, J.C.; MARIA, A. C. B. E.; MAIORKA, P. C.

Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução:** médicos veterinários, proprietários de animais e investidores do mercado pet deparam-se com a preocupação em relação ao ambiente de banho e tosa, que representa um estímulo capaz de levar o animal a quadros de estresse agudo e, possivelmente, ao óbito. É necessário o conhecimento das vias de ocorrência da resposta ao estresse para a elucidação das características das lesões ou agentes causadores e também para a definição do dolo do acontecimento.

**Objetivo:** caracterizar padrões de alteração nos parâmetros fisiológicos e comportamentais antes e depois do banho, com o intuito de tornar viável a detecção e a intervenção precoces nos casos agudos de estresse. **Material e métodos:** foram utilizados 35 cães de dois pet shops. Em cada procedimento

os dados referentes a comportamento e parâmetros fisiológicos (destacando-se: frequência cardíaca – FC; frequência respiratória – FR e temperatura retal – TR) foram coletados antes e após o banho. **Resultados:** a avaliação dos parâmetros fisiológicos após o banho revelou que a maioria dos cães (64,70%) sofreu redução da FC, enquanto 32,35% apresentaram aumento e 2,94% não revelaram alterações. Em relação a movimentos respiratórios, constatou-se que 60,60% dos animais apresentaram elevação da frequência em diferentes graus. Por outro lado, foi de 33,33% a porcentagem de cães com FR reduzida após o banho, enquanto 6,06% dos animais mantiveram a frequência estável. Quanto à variação da temperatura retal, foi constatada discreta diferença entre os grupos de animais que apresentaram aumento (40%) e redução (42,85%). A ausência de alterações foi detectada em 17,14% dos cães. O comportamento observado reflete o padrão de resposta típico de estresse para a vasta maioria dos animais, sendo que a secagem corresponde ao momento mais crítico: 77,14% dos animais apresentaram tremores e mantiveram a cauda abaixada ou entre as pernas e 65,71% manifestaram lambedura constante do plano nasal, por exemplo. **Conclusão:** a crescente preocupação de médicos veterinários e proprietários com o bem-estar animal, assim como a repercussão jurídica que pode existir em casos de óbito durante ou após procedimentos em pet shops, enaltecem a importância de estudos nesta área. Este trabalho, ainda em andamento, pretende obter resultados que auxiliem a rotina, apontando pontos críticos de controle durante os serviços prestados, além de oferecer instruções de conduta em situações de adversidade. **Apoio:** Os autores agradecem o apoio das agências de fomento Capes e FAPESP.

### OCORRÊNCIA DE MACRORHABDUS ORNITHOGASTER EM CALOPSITAS (NYMPHICUS HOLLANDICUS) ATENDIDAS NO AMBULATÓRIO DE AVES FMVZ-USP ENTRE 2010 E 2014

MEIRELLES, C.<sup>1</sup>; CUNHA, F.S.<sup>2</sup>; DAVIES, Y.M.<sup>3</sup>; GUIMARÃES, M.B.<sup>4</sup>; FERREIRA, A.J.P.<sup>5</sup>

1. Graduanda Medicina Veterinária FMVZ/USP. 2. Graduanda Medicina Veterinária FMVZ UNESP Botucatu. 3. Médica Veterinária aprimorada Medicina Aviária, Departamento de Patologia FMVZ/USP. 4. Médica Veterinária Ambulatório de Aves FMVZ/USP. 5. Professor Doutor do Departamento de Patologia – FMVZ/ USP.

**Introdução e objetivos:** a macrorrhabdose é causada pela levedura *Macrorhabdus ornithogaster*, antes classificada como bactéria, que coloniza o istmo entre proventrículo e ventrículo de diversas aves. As calopsitas podem ser susceptíveis, porém a sua presença nem sempre se manifesta por sinais clínicos, e quando ocorre, nota-se desde anorexia a polifagia, apatia, regurgitação, diarreia e presença de sementes nas fezes. O diagnóstico é efetuado pela visualização, em objetiva de imersão, de estruturas gram-positivas, similares a um grande bacilo, em fezes coradas pelo método de GRAM. A não visualização não exclui infecção, pois as aves infectadas podem eliminar o agente intermitentemente. No exame radiográfico pode ser observada uma dilatação proventricular. Infecções bacterianas, parasitárias, virais e outras leveduras devem ser diferenciadas. Como tratamento preconiza-se o uso de antifúngicos via oral. **Material e métodos:** foi realizado um levantamento da presença de *M. ornithogaster* em esfregaços de fezes, corados pelo método de GRAM, de calopsitas com sinais clínicos digestivos atendidas no Ambulatório de Aves da FMVZ - USP no período de abril/2010 a julho/2014. **Resultados e discussão:** doze de 123 amostras examinadas (9,75%) foram positivas. Porém, decorrente de sua eliminação intermitente, resultados negativos não devem ser prontamente desconsiderados. O sexo não pôde ser avaliado, pois na maioria foi indeterminado. A idade média das aves positivas foi de

seis meses, com o intervalo de dois a 24 meses. Essa média baixa pode estar associada ao fato das aves serem adquiridas ainda filhotes em locais com alta densidade populacional e com outros fatores estressantes, levando à imunossupressão da ave o que favorece a ação de agentes oportunistas. Os principais diagnósticos diferenciais devem ser efetuados com Candidíase, Bornavirose, Isosporose e Giardiase, por provocarem sinais similares. Os sinais clínicos mais observados se resumem a apatia, diarreia, hiporexia, penas eriçadas e regurgitação. Não foram observados casos positivos assintomáticos. Apesar do tratamento preconizado ser preferencialmente com anfotericina B, este produto não se encontra disponível no mercado e a nistatina pode ser uma alternativa. **Conclusão:** foram observadas calopsitas jovens positivas para macrorrhabdose, confirmando a sua importância como diagnóstico diferencial frente a uma sintomatologia digestiva.

### OCORRÊNCIA DE CISTOS DE PENAS EM CANÁRIOS (SERINUS CANARIA) ATENDIDOS NO AMBULATÓRIO DE AVES-VPT/HOVET/USP NO PERÍODO ENTRE 2011 A 2014

GUIMARÃES, M.B.; GONÇALVES, C.A.; SANCHES, L.A.; FERREIRA, A.J.P.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** os cistos de pena, também chamados de neoplasias benignas de células foliculares, têm sido descritos na derme e no tecido subcutâneo das aves, sendo os canários (*Serinus canaria*) as espécies mais acometidas. Estas formações podem estar localizadas em qualquer região do corpo com predominância na base das asas e na região dorsal. Tem sido sugerido que essa condição tenha origem genética, hereditária e que esteja relacionada à endocruzamentos. O orifício folicular pode ser obstruído por causa traumática ou infecciosa, acumulando debris queratinosos e formando o cisto folicular. São formados por uma parede epitelial vascularizada circundado por conteúdo queratinizado, variando de acordo com o estágio da muda. O tratamento consiste na excisão cirúrgica dos cistos e em quadros mais graves, pode-se optar pela utilização de anti-inflamatórios e antibióticos via oral. O presente trabalho apresenta o levantamento do número de casos de cistos de penas registrados no período de quatro anos no Ambulatório de Aves (VPT/HOVET) da FMVZ/USP. **Material e métodos:** foi realizado o estudo retrospectivo dos casos registrados nos prontuários do Ambulatório de Aves (VPT/HOVET) da FMVZ/USP. Foram selecionados os prontuários de canários (*Serinus canaria*) atendidos no período de 2011 a 2014, anotadas a idade dos animais, o sexo e os respectivos diagnósticos. A linhagem dos animais não foi analisada, pois houve uma grande diversidade de cruzamentos dentro da espécie muitas vezes este fato era desconhecido dos proprietários. **Resultados e discussão:** dentre os 158 canários atendidos, 38(24,05%) foram acometidos por cistos de penas. Destes animais, 24 foram diagnosticados apenas com cistos de pena e 14 apresentavam doenças concomitantes, como traqueíte, hiperostose polioestótica, tumor em gônada e artrite. Dentre as linhagens mais prevalentes, os canários Norwich, que possuem padrões com penas densas são considerados os mais acometidos, porém neste estudo esta informação não foi considerada devido o desconhecimento pelos proprietários. Quanto à faixa etária dos animais, pôde-se observar maior ocorrência entre dois e três anos, com o total de 12 casos. Não houve predisposição sexual, havendo uma proporção de 24% de acometidos entre machos (30 machos acometidos entre 125) e fêmeas (oito acometidas em 33 fêmeas). A conduta terapêutica predominante foi a excisão cirúrgica dos cistos individuais e em casos mais graves foram utilizados enrofloxacin (10mg/kg) e meloxicam (0,5

mg/kg). Por ter um componente genético, os cruzamentos dessas aves deveriam ser evitados pelos proprietários. **Conclusão:** os cistos de pena são comuns em canários (*Serinus canaria*) e constituem uma patologia de importância significativa na casuística de passeriformes atendidos no Ambulatório de Aves da FMVZ/USP.

### EFEITOS CRÔNICOS DA ADMINISTRAÇÃO DE SEMENTES DE *SENNA OCCIDENTALIS* SOBRE O TECIDO HEMATOPOIÉTICO DE RATOS

TELES, A.V.F.F.; GÓRNIAC, S.L.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

**Introdução:** durante o desenvolvimento de um agente terapêutico um aspecto importante é avaliação da sua toxicidade para a medula óssea e se a mesma é específica para uma ou mais de suas linhagens celulares. Devido à grande capacidade proliferativa do tecido hematopoiético, as células da medula óssea podem ser alvos da ação tóxica de várias substâncias, incluindo produtos à base de plantas. A *Senna occidentalis* (*S. occidentalis*) é uma planta leguminosa tóxica para várias espécies de animais e ocasiona lesões degenerativas, principalmente, nos músculos. Este é o primeiro relato que descreve alterações no tecido hematopoiético de ratos causados por sementes de *S. occidentalis*. O presente trabalho investigou os efeitos do uso crônico de *S. occidentalis* sobre órgãos hematopoiéticos. **Materiais e métodos:** quarenta ratos Wistar machos com 60 dias de idade foram utilizados e divididos em grupos: 1 (controle), 2 (0,5%), 3 (1%) e 4 (2%). Foram estudados os efeitos de 0,5%, 1,0% e 2,0% de sementes de *S. occidentalis* misturadas com ração comercial. Os ratos nos grupos experimentais receberam, diariamente, durante um período de 90 dias, dietas contendo 0,5%, 1%, e 2% de *S. occidentalis*. Os ratos do grupo controle receberam ração sem adição de sementes da planta durante todo o período experimental. Ao término deste período, os animais foram eutanasiados com uma solução de cetamina (50 mg / kg) e xilazina (5 mg / kg). Após o aprofundamento anestésico e a eutanásia dos animais, foi coletada a medula óssea para a determinação da celularidade e mielograma. Foi realizado, também, o estudo anatomopatológico do timo e baço destes animais. **Resultados e conclusões:** a hematotoxicidade pode ser manifestada por alterações no número de células maduras no sangue ou medula óssea. Este estudo mostrou que os ratos do grupo 4 apresentaram uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no número de leucócitos totais ( $4,57 \times 10^9/L$ ) em comparação ao grupo controle ( $6,59 \times 10^9/L$ ). Além disso, houve redução nos valores de hemoglobina (de  $17,21 g/dL$  para  $15,98 g/dL$ ) bem como da razão Mielóide/Eritróide (M/E) (de 3,20 para 2,80). A redução significativa na razão M/E nos animais pertencentes a diferentes grupos experimentais ocorreu devido ao aumento de eritroblastos policromáticos na medula óssea dos animais. O tratamento crônico durante 90 dias com *S. occidentalis* na dieta também promoveu uma redução significativa na celularidade do baço ( $3,80 \times 10^6$  para  $2,32 \times 10^6$  células) e alterações histopatológicas neste órgão. Com base nos dados apresentados, foi constatado que o tratamento crônico por 90 dias com *S. occidentalis* na dieta provocou a hematotoxicidade. **Apoio financeiro:** CNPq.

### AVALIAÇÃO CITOLÓGICA E HISTOPATOLÓGICA DE LINFONODOS REGIONAIS EM CÃES PORTADORES DE MASTOCITOMAS DE GRAUS 1, 2 OU 3 E SUA IMPORTÂNCIA NA DETERMINAÇÃO DA SOBREVIDA (PROJETO EM ANDAMENTO)

CIRILLO, J.V. SANCHES, D.S. PIRES, C.G. UBUKATA, R. TOLEDO, G.F. FONSECA, I.I.M. NISHIYA, A.T. KIMURA, K.C. CHAIBLE, L.M. GRANDI, F. DAGLI, M.L.Z.

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** O mastocitoma é a neoplasia cutânea mais prevalente em cães, correspondendo de 7 a 21% de todas as neoplasias nesta espécie. O índice metastático varia conforme a graduação histopatológica e índices de proliferação da neoplasia. Bostock (1973) e Hume et al. (2011), relataram que mastocitomas bem diferenciados metastatizam em 10% dos casos, enquanto os moderadamente a pouco diferenciados, metastatizam em cerca de 55-96% dos casos, sendo em sua grande maioria, primeiramente para os linfonodos regionais. O presente trabalho investigou a presença de metástases de mastocitomas caninos em linfonodos regionais por meio de análise citológica e histopatológica, procurando correlacionar a sua presença com o grau histológico do tumor e à sobrevida do animal. **Métodos:** será realizada a coleta de citologia dos linfonodos regionais, previamente à sua remoção cirúrgica, com posterior avaliação histopatológica dos mesmos. As reações de histoquímica utilizando azul de metileno e aldeído fucsina de Gomori serão realizadas para evidenciar a presença de mastócitos nos linfonodos. As reações de imuno-histoquímica utilizando como marcadores c-kit e Ki-67 serão empregadas para a confirmação do diagnóstico, assim como para o estabelecimento da correlação ao prognóstico. Será também estabelecida a comparação entre o diagnóstico citológico e histopatológico dos linfonodos quanto à presença de metástases, procurando-se correlacionar a sua presença ao grau histológico do tumor com a sobrevida do animal, por meio da elaboração da curva de Kaplan Meier. Para tanto, foi realizado estudo retrospectivo de cortes histológicos de linfonodos regionais de mastocitomas caninos e os novos casos foram investigados prospectivamente. Os resultados serão analisados por análise multivariada, envolvendo o grau histológico do mastocitoma canino, sua localização, estadiamento TNM e a sobrevida do animal. **Resultados:** Até o presente momento, em 77% dos casos, o diagnóstico citológico corroborou o diagnóstico histopatológico dos linfonodos regionais. Tanto o azul de toluidina como o aldeído fucsina de Gomori foram eficazes na evidenciação de mastócitos em linfonodos. Dos casos avaliados até o momento, observou-se imunomarcagem do c-Kit em padrão de membrana nos mastocitomas bem diferenciados, marcação citoplasmática focal nos mastocitomas moderadamente diferenciados e marcação citoplasmática difusa naqueles pouco diferenciados. A marcação por Ki-67 variou de acordo com o grau de diferenciação da neoplasia, havendo maior porcentagem de núcleos imunomarcados nos mastocitomas pouco diferenciados. Outras análises ainda estão em andamento. **Conclusão:** O exame citológico é um bom exame para diagnóstico de metástase em linfonodo e os marcadores imunohistoquímicos C-kit e ki-67 correlacionam-se ao prognóstico da neoplasia.

## GUARDA RESPONSÁVEL DE ANIMAIS DOMÉSTICOS: UMA AÇÃO A SER EDUCADA

ALVES, A.C.A.M.C.A.<sup>1</sup> ; GENARO, G.<sup>2</sup>

1. Acadêmica e Bolsista do Programa de Iniciação Científica, Departamento de Medicina Veterinária, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, São Paulo. 2. Prof. Dr. de Comportamento e Bem Estar Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Centro Universitário Barão de Mauá, Ribeirão Preto, SP.

**Introdução e objetivos:** O cão (*Canis familiaris*) o e o gato (*Felis s. catus*) são animais domesticados, que estão associados ao homem como animal de estimação por centenas de anos e que têm sido considerados como membros da família. A posse destes animais pode ser benéfica e prazerosa, desde que bem planejada e consciente. Esse trabalho foi delineado para auxiliar na efetividade dos programas de adoção de animais, desenvolvidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Ribeirão Preto – SP. Um questionário foi aplicado para avaliar o grau de conhecimento do futuro proprietário. As respostas foram analisadas, bem como as respectivas dúvidas, o que possibilitou que as informações solicitadas fossem complementadas em campanhas e palestras sobre o bem estar animal, guarda responsável e os cuidados com os futuros animais adotados. **Material e métodos:** o total de 150 questionários foram respondidos pelos pretendentes à adoção dos animais, de ambos os sexos, idades e nível socioeconômico na cidade de Ribeirão Preto e após a análise das respostas, foram realizadas palestras socioeducativas para os pretendentes, sempre abordando a guarda responsável e o bem estar animal dos cães e gatos. **RESULTADOS E Discussão:** a maioria dos pretendentes à adoção estava concentrada na região Oeste da cidade (67%) sugerindo que as três regiões restantes não tinham interesse em adoção ou devido à divulgação ineficaz do programa nestes locais. O número de cães adotados (93%) foi maior que o número de gatos sugerindo a existência de uma predileção da população do município em relação ao cão, ou que a abordagem sobre a aparente resistência a felinos ainda deva ser abordada pelos palestrantes do programa gerando mais informações sobre a espécie. A preferência por fêmeas foi maior do que machos (61%) aumentando a presença deste último gênero no CCZ de Ribeirão Preto. Constatou-se também que o futuro proprietário não tem interesse em castrar seu animal (58%), sendo necessárias mais ações educativas sobre esta questão. **Conclusão:** dentre as questões respondidas, a deficiência quanto às informações foi principalmente quanto à castração que é uma condição preponderante para a guarda responsável e faz parte dos objetivos da campanha de adoção no controle populacional de cães e gatos da cidade. **Apoio financeiro:** Bolsa fornecida pelo programa de Iniciação Científica do Centro Universitário Barão de Mauá – Ribeirão Preto –SP.

## OCORRÊNCIA DE PARASITOS EM RATOS WISTAR (*RATTUS NORVEGICUS*) NAS 4 E 12 SEMANAS DE IDADE

PAIVA, V.L.G.S.<sup>1</sup>; ALVES, M.A.<sup>2</sup>; MORI, C.M.C.<sup>1</sup>; SÁ, L.R.M.<sup>1</sup>.

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil. 2. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

**Introdução e objetivos:** os ratos Wistar são amplamente utilizados como modelo animal em pesquisas biomédicas em diferentes áreas de conhecimento. O controle da condição sanitária dos animais de laboratório é essencial para que não ocorram interferências nos experimentos realizados. O presente trabalho determinou a frequência de ocorrência de endo e ectoparasitos em ratos Wistar do Biotério do Departamento de Patologia (VPT) as quatro e 12 semanas de idade. **Material e métodos:** foram utilizados 40 ratos Wistar do Biotério do VPT com quatro e 12 semanas de idade, dez fêmeas e dez machos por faixa etária. Os animais foram retirados aleatoriamente e foi realizado o exame físico completo individualizado. A eutanásia foi efetuada em dióxido de carbono. A pesquisa de ectoparasitos foi realizada com a aplicação de fita gomada na pelagem nas zonas da base da cauda e dorso, atrás das orelhas, focinho e observando-se ao microscópio ótico. Para a pesquisa de parasitos intestinais e das vias urinárias foi realizado método direto a partir de amostras colhidas durante a necrópsia parasitológica na qual vários segmentos intestinais e a bexiga foram amostrados tiveram a mucosa raspada e analisada ao microscópio ótico e estereoscópio, respectivamente. Foi realizado exame direto com fita gomada da região perianal para pesquisa de ovos de oxiurídeos. A pesquisa de ovos leves e cistos de protozoários foi realizada com as fezes e método de Willis com solução saturada de cloreto de sódio. **Resultados e discussão:** todos os animais apresentavam condição corpórea e estado clínico geral dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie. Nenhum animal apresentou ectoparasitas. Trinta e quatro ratos (34/40, 85%) foram positivos para endoparasitas em pelo menos um dos exames parasitológicos realizados. Os parasitos intestinais identificados foram *Syphacia* spp. (34/40, 85%), *Eimeria* spp. (2/40, 5%) e *Entamoeba muris* (1/40, 2,5%). As vias urinárias apresentaram ausência de parasitos. A frequência relativa percentual da ocorrência de endoparasitas foi 85%, em que 45% correspondem à faixa etária das quatro semanas e, os restantes 40%, as 12 semanas de idade. Os resultados obtidos mostram que a colônia apresenta carga parasitária e que os parasitos identificados são comuns nos biotérios convencionais. A presença dos parasitos indica a necessidade de monitoramento e controle parasitário periódico para atestar condição sanitária adequada. **Conclusão:** A frequência de ocorrência de parasitos intestinais na colônia de ratos do VPT foi de 85%, representados por *Syphacia* spp. (85%), *Eimeria* spp. (5%) e *Entamoeba muris* (2,5%), porém a carga parasitária é baixa, não estava associada a alterações clínicas, porém indica a necessidade de monitoramento e controle parasitário periódico na respectiva colônia. **Apoio Financeiro:** CNPq.

### BLOQUEIO DE RECEPTORES $\beta$ ADRENÉRGICOS ALTERA PARÂMETROS IMUNES EM UM MODELO DE ESTRESSE PSICOLÓGICO: COABITAÇÃO COM PARCEIRO DOENTE

MARGATHO, R.O.; CRUZ, D.G.; CALEFI, A.S.; LIMA, A.P.N.; QUINTEIRO-FILHO, W.M.; BORSOI, A.; MASSOCO, C.O.; PALERMO-NETO, J.

Faculdade de Medicina Veterinária-USP-São Paulo

**Introdução:** o sistema nervoso simpático (SNS) contribui para os efeitos relacionados ao estresse com a síntese de catecolaminas por meio de inervações simpáticas em tecidos linfóides. Já foi demonstrado que a coabitação com parceiros da mesma espécie portadores da forma ascítica do tumor de Ehrlich (T.A.E), determina um estresse psicológico, que provocou nos animais companheiros mudanças em parâmetros comportamentais e imunes. Tem sido demonstrado que os tumores produzem componentes orgânicos voláteis, que são liberados para a atmosfera pela urina, suor e respiração. Analisando-se esta vertente, foi aventada a hipótese de que os odores liberados pelas camundongas injetadas com o tumor seriam responsáveis pelas mudanças neuroimunes relatadas nos conspecificos saudáveis e que os roedores teriam a sua fisiologia e homeostase modificadas por esta estimulação olfativa aversiva. **Objetivos:** Estudar os efeitos do bloqueio de receptores  $\beta$ -adrenérgicos sobre parâmetros de imunidade inata em um modelo de estresse induzido pela coabitação (11 dias) com um parceiro inoculado com T.A.E. **Métodos:** 1- Formação dos grupos: Os experimentos foram realizados com 64 camundongas Swiss (7-9 semanas) divididas em quatro grupos iguais (oito/grupo). Uma camundonga em cada par no grupo controle foi tratada (i.p) com o veículo (dia experimental 1 - ED1) e a outra foi mantida intocável até ED6 e foi referida como CHP (companheiro de parceiro saudável). Entre ED6 e ED11 estes CHP foram tratados com veículo (CHP1) ou com propranolol (CHP2). Nos grupos experimentais, um animal por par de camundongos foi inoculado com  $5 \times 10^6$  células de tumor de Ehrlich (i.p) e o outro animal não foi manipulado até ED6 e foi referido como CSP (companheiro do parceiro doente). Entre ED6 e ED11 os CSP foram tratados com veículo (CSP1) ou com propranolol (CSP2). 2- Fármacos: Propranolol -antagonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo diluído em solução de NaCl 0,9%; usado na dose 20 mg/kg/dia por via i.p. para avaliação por citometria de fluxo das células NK esplênicas e plasmáticas. 3- A quantificação da corticosterona sérica foi realizada por um kit de ELISA conforme as instruções do fabricante. 4- As glândulas foram retiradas cirurgicamente e pesadas em balança de precisão para a análise do peso relativo do órgão (peso glândula adrenal/peso total do animal). 5- ESTATÍSTICA: Na análise estatística foram consideradas significantes as análises com  $p < 0,05$ . **Resultados e conclusões:** foi demonstrada uma maior migração de células NK do sangue para o baço de companheiros do animal doente (CSP); este parâmetro foi revertido pelo pré-tratamento com propranolol. A administração de propranolol não interferiu com os níveis de corticosterona sérica e com o peso relativo das glândulas adrenais.

### DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR MYCOBACTERIUM BOVIS EM RÃ-TOURO (LITHOBATES CATESBEIANA)

REISFELD, L.; SILVATTI, B.; IKUTA, C.; OLIVEIRA, G.; SOARES, J.; SALVAGNI, F.; ANDRÉ, F.; CATÃO-DIAS, J.L.

As micobactérias têm sido reconhecidas como uma fonte de morbidade e mortalidade em anfíbios. Até o presente, todos os casos descritos nestes animais foram de micobactérias atípicas. O presente trabalho descreve um caso de micobacteriose em *Lithobates catesbeiana* causado por *Mycobacterium bovis*. O animal era mantido em cativeiro há cinco anos, vindo a óbito sem a detecção de qualquer alteração clínica evidente. À necropsia, foi observada a presença de 5 ml de líquido translúcido de consistência viscosa na cavidade celomática. Macroscopicamente, pulmão, fígado, baço, intestino e rins apresentavam coloração enegrecida com presença de lesões nodulares multifocais, de aproximadamente 0,1-0,2 mm. Swabs de todos os órgãos acometidos foram realizados, acondicionados em meio de Stuart e encaminhados para exame microbiológico. Não foram observadas outras alterações macroscópicas, e fragmentos de todos os órgãos foram acondicionados em formol 10% e submetidos à realização de exame histopatológico. O exame citopatológico do líquido celomático evidenciou grande quantidade de material proteináceo, acompanhada por pequena quantidade de eritrócitos, raras células mononucleares, detritos celulares e escamas cutâneas, compatível com transudato modificado. A histopatologia revelou em pulmão, baço, intestino, fígado, pâncreas e rim a presença de múltiplos granulomas repletos por bacilos álcool-ácido resistentes (BAARS), evidenciados pela coloração de Ziehl-Neelsen. Notou-se também congestão difusa, focos de hemorragia, extensas áreas de necrose e hiperplasia dos centros de melanomacrófagos. O resultado histopatológico foi compatível com micobacteriose. Para a tentativa de isolamento de micobactérias, uma amostra de swab dos órgãos foi tratada com cloreto de 1-hexadecilpiridínio (HPC) a 1,5%, semeada em Stonebrink e Löwenstein-Jensen e incubada a 37°C por 90 dias. Os BAARS isolados foram classificados como pertencentes do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e identificados como *Mycobacterium bovis*, pela técnica de PCR multiplex com base na combinação de iniciadores com regiões alvo, 16S rRNA e MTB70, e das regiões genômicas de diferença RD9 e RD12, respectivamente. Este trabalho apresenta o primeiro relato de infecção de anfíbios por um membro do complexo *M. tuberculosis*, especificamente por (*M. bovis*) e realça a existência de implicações sanitárias relevantes, uma vez que estes animais são comumente utilizados na alimentação humana.

### VALORES DE REFERÊNCIA DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, C57BL/6, BALB/C E RATOS Wistar

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.; BELTRAN, J.S.O.; SILVA, G.B.; TSUJITA, M.; CARMO, L.S.; CRISMA, A.R.; FOCK, R.A.; BORELLI, P.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.

O estabelecimento dos valores de referência hematológica e bioquímica clínica em animais de laboratório é de suma importância para a análise de alterações funcionais, no entanto, ainda há poucos dados disponíveis para diversos grupos de animais. O presente trabalho foi delineado para estabelecer os valores de referência para os parâmetros hematológicos e bioquímicos em linhagens comuns de camundongos e ratos usados em experimentação animal. Os parâmetros avaliados foram: perfil sanguíneo (hemograma, reticulócitos e mielograma) e a bioquímica do soro (proteína total, albumina, glicose,

colesterol, triglicérides, cálcio e fósforo). Foram utilizados camundongos C57BL/6, BALB/C e Swiss Webster e ratos Wistar, machos de dois a três meses de idade. As amostras de sangue total foram obtidas por punção do plexo axilar dos animais anestesiados com xilazina (16 mg/kg) e ketamina (120 mg/kg) e recolhidas utilizando-se como anticoagulante (EDTA) a 10%. As amostras de sangue recolhidas sem anticoagulante foram usadas para a obtenção dos soros utilizados para determinação de níveis de colesterol total, triglicérides, glicose, albumina e total de proteína. A dosagem de hemoglobina, hematócrito e contagem total de eritrócitos e leucócitos foram efetuadas no analisador de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics). As dosagens de proteínas totais e albumina revelaram uma maior concentração dessas substâncias em ratos, bem como a contagem de leucócitos totais em relação às linhagens de camundongos. Os demais parâmetros hematológicos e bioquímicos não apresentaram diferenças significativas. No entanto, foi estabelecida uma variação normal dentro de cada espécie. Os resultados obtidos permitem a padronização dos intervalos de referência em animais criados em biotério, refletindo assim a condição esperada em roedores utilizados em pesquisas científicas. **Apoio financeiro:** CNPq; CAPES; FAPESP.

### **AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO ASSOCIADOS À TRANSIÇÃO EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO CANCEROSAS ORIUNDAS DE NEOPLASIAS MAMÁRIAS DE CADELAS (PROJETO EM ANDAMENTO)**

XAVIER, P.<sup>1</sup>; CORDEIRO, Y.<sup>1</sup>; ROCHETTI, A.<sup>1</sup>; FUKUMASU, H.<sup>1</sup>.

1. Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP.

**Introdução e objetivos:** assim como em mulheres, as neoplasias mamárias representam o tipo mais frequente de câncer em cadelas. Esse tipo de neoplasia apresenta grande heterogeneidade celular o que torna complexa a sua classificação histopatológica, além de possivelmente ser o fator responsável pela grande diversidade de resposta aos tratamentos de eleição como exérese e quimioterapia. Recentemente tem sido estudado um grupo de células denominadas células-tronco cancerosas (CTCs), descritas como as principais responsáveis pelas falhas nas quimioterapias, formação de metástases e no aparecimento de recidivas tumorais, o que as torna um importante alvo para terapias específicas. Entretanto, alguns problemas são o seu isolamento e cultivo. Alguns estudos recentes realizaram indução do processo de transição epitélio-mesenquimal com a superexpressão de alguns fatores de transcrição como, Twist, Snail e ZEB, promovendo linhagens com capacidade de manutenção de características de CTCs. O presente trabalho foi delineado para a avaliação da expressão gênica dos fatores de transcrição associados à transição epitélio-mesenquimal em diferentes cultivos de células oriundas de neoplasias mamárias de cadelas, para futuramente ser utilizada a sua superexpressão como potencial indutor deste processo em cultivos celulares.

**Material e métodos:** quatro linhagens celulares foram caracterizadas quanto sua malignidade segundo o tempo de duplicação, cariótipo e expressão de marcadores como citoqueratina e vimentina. As células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 1% MEGS, 0,5% de SFB e 1% de antibiótico. Ao ser atingido 80% de confluência tiveram seu RNA total extraído pelo reagente Trizol (Life Technologies). A quantidade e a qualidade do RNA total foram avaliadas (BioAnalyzer Agilent). A conversão de mRNA para cDNA foi realizada com o Kit SuperScript III Reverse Transcriptase (Life Technologies) que será utilizado para análise de expressão gênica por Real-Time PCR dos fatores de transcrição (FT) ZEB1, ZEB2, STAT3 e Slug.

O FT que apresentar menor expressão nas quatro linhagens será escolhido para a técnica de transgenia para sua superexpressão. **Resultados:** Quatro linhagens celulares oriundas de neoplasias mamárias (020/14; 025/14, 028/14 e 030/14) já foram isoladas e caracterizadas em testes de cariótipo, tempo de duplicação e expressão de marcadores citoqueratina e vimentina. Além disso, já foi realizada a padronização da técnica de expressão gênica para os genes ZEB1 e ZEB2. **Conclusão:** Pela padronização dos primers, pode-se sugerir a existência de baixa expressão dos genes ZEB1 e ZEB2 nas quatro linhagens estudadas. Porém, ainda é necessária a realização de estudos de análise de expressão gênica para confirmação dos dados. **Apoio financeiro:** CNPq e CAPES.

### **ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE HIF1-A EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS (PROJETO EM ANDAMENTO)**

CAMPOS, I.E.; BARRA, C.N.; PULZ, L.H.; STREFEZZI, R.F.

Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Departamento de Medicina Veterinária, FZEA-USP. Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635-900, Pirassununga, SP, Brasil.

**Introdução e objetivos:** a malignidade e o alto poder metastático são características dos mastocitomas cutâneos dos cães o que torna cada vez mais importante o estudo de indicadores prognósticos que norteiem pesquisas em busca de novos tratamentos. A hipóxia tumoral é um evento frequente em neoplasias malignas, capaz de alterar o microambiente por meio de modificações na expressão de gênica. Para contornar a baixa oxigenação celular, este conjunto de modificações poderá piorar ou melhorar o prognóstico da neoplasia. O aumento da expressão do HIF1- $\alpha$  (Fator Induzível por Hipóxia do tipo 1 alfa), que pode ser encontrado na sua forma ativa e em grande quantidade no tecido submetido à hipóxia, permite a sobrevivência da célula neoplásica em ambiente hostil. Este fator de transcrição interage com a sequência de DNA HRE (Elementos de Resposta à Hipóxia), codificando inúmeros genes envolvidos com a angiogênese, como os das metaloproteinases de matriz e de importantes fatores de crescimento, como o VEGF e angiopoetinas. Desse modo, o HIF1- $\alpha$  pode ser responsável por conferir nova vasculatura à massa tumoral. Muitas vezes, as capacidades metastática e tecidual também são potencializadas pelo HIF1- $\alpha$ , sendo este relacionado por muitos autores à malignidade tumoral. A alta prevalência de mastocitomas em cães requer estudos que confirmem a natureza promotora ou supressora deste fator transcricional. Por isso, o presente projeto foi delineado para avaliar a presença de HIF1- $\alpha$  em mastocitomas de cães utilizando a técnica de imuno-histoquímica, de modo a serem estabelecidas relações que permitam a verificação se o HIF1- $\alpha$  é um bom indicador prognóstico para esta neoplasia.

**Material e métodos:** as amostras de mastocitomas serão processadas de acordo com as técnicas rotineiras de inclusão em parafina e os cortes histológicos serão corados pela hematoxilina e eosina para graduação das lesões e para processamento imuno-histoquímico. Este último será realizado com o anticorpo anti-HIF1- $\alpha$  (Abcam, ab463) e, para o controle negativo, a IgG de camundongo na mesma diluição. A quantificação das marcações será determinada pela porcentagem de células positivas em cinco campos de marcação intensa ("hot spots"). Os resultados serão comparados à graduação histopatológica, mortalidade em função do tumor e sobrevida. **Resultados preliminares:** a aplicação do anticorpo de acordo com as recomendações do fabricante ainda não apresentou resultados específicos e, por este motivo, encontram-se em teste novas variações do protocolo imuno-histoquímico.

**Apoio financeiro:** FAPESP (processos: 2013/13252-8 e 2014/06129-8).

## VALORES HEMATOLÓGICOS DE URUBUS-DA-CABEÇA-PRETA (*CORAGYPS ATRATUS*) DE VIDA LIVRE EM SÃO PAULO, SP

BARBARA, J.C.A.<sup>1</sup>; FERREIRA, V.L.<sup>1</sup>; GUIDA, F.J.V.<sup>2</sup>; PRIOSTE, F.E.S.<sup>1</sup>; MATUSHIMA, E.R.<sup>1</sup>; RASO, T.F.<sup>1</sup>.

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2. Setor de Aves, Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZ-SP), São Paulo, SP.

**Introdução e objetivo:** a espécie urubu-da-cabeça-preta (*Coragyps atratus*) ocorre em todo o Brasil e grandes grupos podem ser facilmente observados em regiões de lixões ou despejo de dejetos. Seu papel ecológico é bem conhecido, porém, as suas doenças e causas de morte ainda não foram elucidadas. A hematologia é um importante elemento fornecedor de informações complementares que auxiliam no diagnóstico de doenças. Para se fazer a interpretação dos exames hematológicos é necessário que os resultados sejam comparados a valores de referência, entretanto os dados hematológicos que sirvam de parâmetros normais para urubus são escassos na literatura. O presente trabalho descreve os valores hematológicos de urubus-de-cabeça-preta. **Métodos:** com a utilização de gaiolas, 61 urubus adultos e sem sinais clínicos de doença, foram capturados na área da Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Das aves contidas fisicamente foram coletados 2 ml de sangue por punção da veia metatarsal medial. As amostras de sangue foram armazenadas em tubos com EDTA, refrigeradas e levadas ao laboratório. Para quantificação de hemácias e leucócitos, uma alíquota do sangue foi diluída em solução de Natt e Herrinck (1:200) e a quantificação foi efetuada em hemocítmetro utilizando-se microscópio de luz convencional (100X). A hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (absorbância de 540nm). O hematócrito foi determinado pelo método do microhematócrito e a proteína plasmática total foi mensurada em refratômetro utilizando-se alíquotas de plasma obtidas por centrifugação do sangue. Após análise estatística foram calculados a média e desvios padrão dos parâmetros investigados.

**Resultados e discussão:** as médias e os desvios padrão dos parâmetros avaliados foram:  $1,8 \pm 0,3 \times 10^6$  hemácias/mm<sup>3</sup>;  $13874 \pm 5385$  leucócitos/mm<sup>3</sup>;  $7,7 \pm 2,2$  g/dl de hemoglobina; hematócrito (Ht) de  $48 \pm 3$  %; VCM de  $270 \pm 50$  fL; HCM de  $42 \pm 12,6$  pg; CHCM de  $16 \pm 4,45$  g/dL;  $3,76 \pm 0,51$  g/dl de proteína plasmática total (PPT). Os valores médios do Ht e da PPT são semelhantes ao Ht ( $49,8 \pm 0,53$ %) e a PPT ( $4,2 \pm 0,07$  g/dL) encontrado para *C. atratus* em um estudo desenvolvido nos EUA. Os demais resultados foram comparados com valores de referência para rapinantes. Foram observadas similaridades com valores de abutre-preto (*Aegyptius monachus*), urubus-de-cabeça-vermelha (*Cathartes aura*) e algumas espécies da família Accipitridae. Diferenças acentuadas foram notadas em comparações com valores de diversas espécies de rapinantes. **Conclusão:** os resultados obtidos fornecem dados hematológicos importantes para o estabelecimento de parâmetros hematológicos para *C. atratus*. A variação entre os dados deste trabalho com os de outros rapinantes ressalta a importância da padronização de valores de referência para a espécie. **Apoio financeiro:** CNPq.

## CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DE CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS DA FRAÇÃO ESTROMAL VASCULAR DE TECIDO ADIPOSE DE CÃES

MAGALHÃES, A.I.; MASSOCO, C. O.

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

A caracterização fenotípica e o isolamento de células-tronco hematopoiéticas (CTH) podem fornecer informações relevantes quanto ao desenvolvimento biológico do sistema hematopoiético. A habilidade em detectar e purificar essas células implica no desenvolvimento de condições para a sua manutenção e expansão em culturas in vitro. Na medicina veterinária, a purificação de células-tronco hematopoiéticas caninas (CTHc) tem a finalidade de desenvolver terapias celulares, principalmente em doenças que levam à aplasia medular ou anemia aplástica nesta espécie animal. A escassez de informações sobre a caracterização fenotípica e a capacidade de proliferação e pluripotência celular de CTHc precisa ser superada. No presente trabalho com o emprego da análise imunofenotípica e de ensaios CFU, foi efetuado o isolamento, a caracterização e a expansão, de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas provenientes da fração estromal vascular (FEV) do tecido adiposo de cães. Os resultados obtidos demonstraram que, para o isolamento destas células o painel de imunofenotipagem CD45-/CD117+/CD34+ apresentou melhores resultados que o CD45-/CD38-/low/CD34+. Além disso, a detecção da atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) também pode ser uma grande aliada no enriquecimento desta fração celular. Por meio das técnicas empregadas no presente trabalho foi constatado que no tecido adiposo canino a frequência de CTH é baixa. **Apoio financeiro:** PROAP-VPT-FMVZ-USP.

## ANÁLISE DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA FRENTE A ESTIRPES NEUROTRÓPICAS DO HERPESVÍRUS EQUINO TIPO 1 EM CAMUNDONGOS ISOGÊNICOS NOS SEGUNDO E TERCEIRO DIA APÓS INFECÇÃO POR MEIO DO MÉTODO DE CITOMETRIA DE FLUXO

TONIETTI, P.O.<sup>1</sup>; MORI C.M.C.<sup>1</sup>; MESQUITA, L.P.<sup>1</sup>; ARÉVALO, A.F.<sup>1</sup>; QUEIROZ, N.G.T.<sup>1</sup>; GAMON, T.H.M.<sup>1</sup>; LARA M.C.C.S.H.<sup>2</sup>; VILLALOBOS E.M.C.<sup>2</sup>; CUNHA E.M.S.<sup>2</sup>; MASSOCO, C.O.<sup>1</sup>; MORI E.<sup>3</sup>; MAIORKA P.C.<sup>1</sup>

1 Departamento de Patologia Experimental e Comparada, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2. Instituto Biológico – São Paulo. 3. Instituto Pasteur, São Paulo - SP, Brasil.

**Introdução e objetivos:** o herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1), importante patógeno para os equinos pode provocar quadros de rinopneumonia, abortamento, mortalidade perinatal e mieloencefalopatia herpética equina (EHM). Para o estudo desse vírus, devido às similaridades encontradas com a infecção e a resposta imune no cavalo, o camundongo tem sido utilizado como modelo biológico. No presente trabalho foi efetuada a quantificação das concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, e da quimiocina CCL2 (MCP-1) em camundongos isogênicos inoculados por via intranasal com as estirpes brasileiras A4/72 e A9/92 do EHV-1. Material e **Métodos:** fêmeas de camundongos BALB/c, C57BL/6 e C3H/HeJ com oito semanas de idade foram inoculadas pela via intranasal com as estirpes A4/72 e A9/92 do EHV-1. Os camundongos dos grupos controle receberam apenas meio essencial de Eagle pela via intranasal. A coleta do sangue foi efetuada nos 2º e 3º dpi. As concentrações plasmáticas de IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e CCL2 foram mensuradas com o Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kit. Os resultados foram analisados com o programa estatístico

Graph Pad InStat (versão 3.01, 32 bit for Windows 95/NT). **Resultados e discussão:** no 2º dpi todas as linhagens de camundongos apresentaram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  e CCL2 quando infectados com a estirpe A4/72 do EHV-1. A exceção foi a linhagem C57BL/6 que não apresentou aumento apenas de CCL2. Já os animais inoculados com A9/92 apresentaram aumento apenas de IFN- $\gamma$  e CCL2. Já no 3º dpi todas as linhagens de camundongos apresentaram aumento de IL-6, TNF- $\alpha$  e CCL2 quando inoculados com A4/72. A exceção foi a linhagem C3H/HeJ que não apresentou aumento significativo de TNF- $\alpha$ . Observou-se ainda que todas as linhagens inoculadas com A4/72 apresentaram elevações nos valores de TNF- $\alpha$  superiores aos observados nas infectadas com A9/92. Esse achado ressalta a variação das características intrínsecas das estirpes virais. De um modo geral, a comparação da concentração das citocinas pró-inflamatórias do 2º dpi para o 3º dpi apresentou aumento significativo de IL-6 e diminuição de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CCL2, havendo pouca ou nenhuma diferença entre as três linhagens isogênicas estudadas. **Conclusão:** Os achados do presente estudo indicaram que o desafio viral com as estirpes neurotrópicas do EHV-1 em camundongos induziu a produção de IFN- $\gamma$  que estimulou a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e CCL2. A diminuição da concentração de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e CCL2 do 2º dpi para o 3º dpi sugere que este fato pode estar relacionado a um mecanismo de escape do EHV-1 ou à sua capacidade de modificar a resposta imune do hospedeiro. Portanto, eles devem desempenhar um papel importante na fisiopatogenia da EHM. **Apoio Financeiro:** Projeto FAPESP nº 2012/24769-9.

### EFEITOS NEUROIMUNOMODULADORES DE UM MODELO DE ESTRESSE AGUDO DE CONTENÇÃO

LIMA, A.P.N.; DA CRUZ, D. S. G.; MASSOCO, C. O.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

**Introdução e objetivos:** a ativação prolongada do sistema nervoso simpático e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na resposta ao estresse pode gerar alterações no comportamento e no sistema imune de um indivíduo. No entanto, os efeitos imunomoduladores de um estresse agudo são ainda controversos e pouco investigados. As células dendríticas e os linfócitos são elementos essenciais para a resposta imune adaptativa, atuando como células apresentadoras de antígenos e células efetoras respectivamente. O presente trabalho investigou as alterações na atividade locomotora, na ansiedade e no fenótipo de DCs e de linfócitos esplênicos de camundongos BALB/c machos estressados por um modelo de estresse agudo de contenção (protocolo do comitê de ética 2568/2012). **Métodos:** o grupo experimental foi submetido a três sessões (em dias alternados) de contenção em tubos plásticos (14x7cm) por duas horas em cada sessão. Imediatamente após a última sessão de estresse, os animais foram avaliados em testes comportamentais (campo aberto e labirinto em cruz-elavado) e em seguida eutanasiados para a coleta de sangue e remoção do baço. A análise do fenótipo de linfócitos e DCs foi realizada por citometria de fluxo com os marcadores: MHCII, CD11c, CD80, CD86, CD40, CCR-7 CD3, CD4, CD8 e CD28. **Resultados:** os resultados obtidos demonstraram que os animais estressados apresentaram aumento da ansiedade e diminuição da expressão de moléculas CD28 em linfócitos CD8+ e de moléculas CD40 em células dendríticas. **Conclusões:** um estresse moderado e de curta duração além de causar alterações comportamentais também altera o fenótipo das células imunes. **Apoio financeiro:** FAPESP.

### ANÁLISE TEMPORAL DO COMPORTAMENTO DOENTIO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO EM RATAS VIRGENS E LACTANTES

NASCIMENTO, A.F.<sup>1</sup>; BERNARDI, M.M. B; MASSOCO, C.<sup>1</sup>; PECORARI, V.<sup>2</sup>; FELÍCIO, L.F.<sup>1</sup>

1 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. 2 Universidade Paulista, Instituto de Ciências da Saúde, São Paulo, Brasil.

**Introdução e objetivo:** o lipopolissacárido (LPS), uma endotoxina que se origina da parede celular de bactérias Gram-negativas, ativa o sistema imune dos hospedeiros infectados que libera citocinas pró-inflamatórias indutoras de comportamento doentio. O presente trabalho caracterizou os efeitos do LPS dependentes do tempo, analisando a temperatura e peso corporais, o consumo de água de alimentos em ratas virgens e lactantes expostas a uma dose de LPS anteriormente relatada como capaz induzir o comportamento doentio em ratas prenhas. **Métodos:** ratas Wistar, virgens na fase estro e lactantes no terceiro dia da lactação receberam 100 µg/kg de LPS ou solução salina. A temperatura timpânica, peso corporal e consumo alimentar e de água foram avaliados 0, 2, 24, 48, 72, 96, e 120 horas após o tratamento. **Resultados:** em ratas lactantes, a temperatura timpânica foi atenuada em comparação a observada nas ratas virgens. O consumo alimentar e ganho de peso corporal diminuiu em ambos os grupos, mas as ratas lactantes consumiram mais alimentos do que as virgens. O consumo de água aumentou nos diversos tempos. **Conclusão:** a exposição ao LPS determinou o aparecimento de sinais de comportamento doentio representados por: diminuição no consumo alimentar e do ganho de peso e aumento de consumo de água tanto em fêmeas virgens como nas lactantes. O curso e perfil de hipertermia variaram ao longo do tempo entre lactantes e virgens, pareceu depender do estado fisiológico dos animais.

### UNCARIA TOMENTOSA (UNHA-DE-GATO) POSSUI ATIVIDADE IMUNOMODULATÓRIA SOBRE A RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE RATOS

MENDES, P.F.<sup>1</sup>; PONCE, F.<sup>1</sup>; HUEZA, I.M.<sup>1,2</sup>

1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) - Departamento de Patologia - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2. Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Campus Diadema.

**Introdução e objetivos:** a *Uncaria tomentosa* é uma planta medicinal mundialmente empregada na forma de fitoterápico devido às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias. O presente trabalho empregou o protocolo proposto pelas principais agências internacionais de regulamentação toxicológica para investigar a possível modulação das respostas imune humorais de ratos que receberam este fitoterápico por 90 dias. **Métodos:** quarenta ratos machos foram divididos em quatro grupos iguais e tratados, pela via oral (gavagem), com as doses de 0, 15, 75 e/ou 150mg/kg de extrato seco de *Uncaria tomentosa* diluído em água. Sete dias antes do final do período experimental, todos os animais foram sensibilizados intraperitonealmente com 1 mL de eritrócitos de carneiro (SRBC) (2,0 x 10<sup>9</sup> eritrócitos/mL). No final do período experimental, os animais foram eutanasiados e tiveram os seus esplenócitos coletados, contados e ajustados para a concentração de 12,0 x 10<sup>6</sup> células/mL. Para realização do ensaio do PFC, os esplenócitos, juntamente com os SRBC e o soro de cobaia (fonte de sistema complemento), foram adicionados a uma solução de bacto ágar a 0,5% e plaqueados em lâminas de

histologia. Após três horas em estufa a 37°C, as lâminas foram visualizadas ao microscópio e os halos de lise de SRBC foram contados, e representados como número de PFC/105 esplenócitos. **Resultados:** apesar da ausência de significância estatística ( $p < 0,06$ ), verificou-se que o fitoterápico promoveu um aumento dose-dependente no número de linfócitos produtores de anticorpos específicos anti-SRBC, em resposta ao desafio antigênico. **Conclusões:** considerando a maior produção de anticorpos T-dependentes frente a desafio imune específico pode-se afirmar que a administração da *U. tomentosa* apresentou atividade imunomodulatória sobre a resposta imune humoral de ratos. **Apoio financeiro:** FAPESP (proc. nº. 2012/09565-8).

### **PATOLOGIA COMPARADA DAS MALFORMAÇÕES CONGÊNITAS EM *BOTHRUPS JARARACA* E *CROTALUS DURISSUS* PROVENIENTES DO SUDESTE BRASILEIRO**

CARVALHO, M.P.N.<sup>1</sup>; SANT'ANNA, S.S.<sup>2</sup>; GREGO, K.F.<sup>2</sup>; GOGONE, I.C.V.P.<sup>1</sup>; FONSECA-PINTO, A.C.B.C.<sup>3</sup>; LORIGADOS, C.A.B.<sup>3</sup>; CATÃO-DIAS, J.L.<sup>1</sup>

1 Laboratório de Patologia Comparada, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo 2 Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan 3 Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

As malformações congênitas ou teratogênias são processos patológicos definidos como defeitos estruturais que se originam durante a vida embrionária. Sua ocorrência tem sido relatada em todas as classes de vertebrados e geralmente são incompatíveis com um período de vida prolongado. Uma ampla variedade de malformações é descrita em répteis, principalmente nas espécies que compreendem a ordem Squamata. Acredita-se que as malformações nestes animais ocorram devido a causas genéticas e/ou ambientais, incluindo a baixa variabilidade gênica de algumas populações, as alterações de temperatura e umidade ambientais, e a poluição do meio-ambiente. A caracterização dos processos patológicos envolvidos nestas anomalias é de fundamental importância para a compreensão dos fatores que interferem com a conservação dos vertebrados em geral e, no que remete ao presente trabalho, das serpentes em específico. O presente trabalho caracterizou as alterações macroscópicas e histopatológicas observadas em 102 serpentes nascidas de mães de vida livre e acometidas por teratogênias, compreendendo as espécies *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus*. As características macroscópicas das lesões foram avaliadas por exames morfométricos, radiográficos, microtomográficos e necroscópicos. Alterações histopatológicas foram identificadas por análise óptica de luz em materiais submetidos a métodos citoquímicos rotineiros e especiais. As serpentes da espécie *B. jararaca* apresentaram lesões axiais mais severas que as da espécie *C. durissus*. Nas análises intraespecíficas, fêmeas de *C. durissus* apresentaram lesões axiais mais severas que os machos. Em relação à distribuição destas lesões, os indivíduos da espécie *C. durissus* apresentaram o terço final da coluna como a região mais acometida pelas malformações axiais. A caracterização microtomográfica de teratogênias específicas (anoftalmia, bicefalia, buftalmia, cauda enrodilhada, ciclopia, cifoesciose, hidrocefalia, lordose, malformação cefálica e prognatismo), permitiu a análise e a documentação das alterações morfológicas originais para serpentes tais como a agenesia dos ossos frontal, parietal e supraoccipital em *B. jararaca* portadora de malformação cefálica. A relação entre as alterações histopatológicas e as malformações revelou a existência de correlação entre a incidência de doenças renais císticas em serpentes acometidas por braquignatia, quadros inflamatórios oculares em serpentes com buftalmia e a desorganização

das fibras musculares periaxiais e fusão de corpos vertebrais em serpentes portadoras de lordose. O levantamento efetuado no presente trabalho constitui uma base de informações úteis para estudos futuros no campo da patologia, teratologia, embriologia e ecotoxicologia de serpentes. **Apoio financeiro:** CNPq e FAPESP.

### **ERROS MÉDICOS VETERINÁRIOS: CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA E CIRCUNSTÂNCIAS DE OCORRÊNCIA EM ANIMAIS SUBMETIDOS À NECROPSIA**

MARIA, A.C.B.E.; SALVAGNI, F.S.; SIQUEIRA, A.; MESQUITA, L. P.; MAIORKA, P.C.

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP - Universidade de São Paulo – SP, Brasil

**Introdução:** o médico veterinário tem por obrigação agir com diligência e cuidado no exercício de sua profissão, uma vez que a atuação de profissionais ineptos pode culminar no erro médico. O erro médico é definido como o mau resultado ou resultado adverso decorrente de ação ou da omissão do médico, caracterizada por imperícia, imprudência ou negligência. **Objetivo:** o presente trabalho caracterizou os erros médicos veterinários observados nas necropsias realizadas no Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP, bem como as circunstâncias de ocorrência dos mesmos. **Método:** de uma população de 1634 animais necropsiados entre janeiro de 2008 a maio de 2013 no Serviço de Patologia Animal da FMVZ/USP, 26 casos foram selecionados com base em seus históricos e achados necroscópicos compatíveis com erro médico veterinário. **Resultados:** dos 26 casos selecionados, mais de 57% são de caninos domésticos, seguido por felinos domésticos, equinos, bovino, ovino e réptil. Em relação à raça, foi constatada uma maior prevalência dos animais sem raça definida. Quanto à idade, os animais idosos, acima de oito anos de idade, apresentaram uma maior frequência entre os casos selecionados; dentre o sexo dos animais, foi observada uma maior incidência de fêmeas, abrangendo 65% do total de casos. Em relação às circunstâncias de ocorrência dos erros médicos, 38% vieram a óbito em decorrência de negligência e 69% dos erros médicos estão associados à incompatibilidade de diagnóstico de doenças. **Conclusão:** O médico veterinário tem obrigação profissional, ético e civil, de exercer com excelência a sua profissão, dado que pode ser responsabilizado tanto civil quanto criminalmente no caso de comprovação de danos ocasionados aos pacientes. **Apoio:** Agradecemos o apoio das agências de fomento Capes, CNPq e Fapesp.

### ANÁLISE FUNCIONAL E FENOTÍPICA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CANINAS GERADAS *IN VITRO* E ATIVADAS POR DIFERENTES ESTÍMULOS BIOLÓGICOS – RESULTADOS PARCIAIS (PROJETO EM ANDAMENTO)

SILVA, M.B.; MASSOCO, C.O.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Os cães são acometidos por doenças inflamatórias e neoplásicas que apresentam diversas similaridades com quadros registrados em seres humanos e se constituem em um importante modelo animal para a realização de investigações de patologia comparada. As células dendríticas (DCs), na atualidade, consideradas como a população mais potente de células apresentadoras de antígenos são um alvo promissor para a imunoterapia de cães; no entanto o uso terapêutico de DC caninas ainda é limitado, pois as técnicas de isolamento ainda não foram padronizadas e as informações específicas da espécie a esse respeito ainda são insuficientes. O presente projeto foi delineado para avaliar a geração *in vitro* de células dendríticas caninas pulsadas com diferentes doses de lisado tumoral (melanoma canino), bem como, de investigar os seus efeitos sobre a caracterização imunofenotípica e funcional de DCs maduras. Está sendo empregado o buffy coat de bolsas de sangue caninas coletadas pelo Banco de Sangue do HOVET-USP, nas quais por meio de Ficoll 1077g/dL são isolados linfomonucleares que darão origem a DCs após cultivo celular com meio contendo citocinas recombinantes canina (GM-CSF) e interleucina 4 (IL-4). No sétimo dia de cultivo as células do grupo controle e DCs são incubadas com anticorpos MHC de classe II, CD11c, CD86, F4/80 e analisadas em citômetro de fluxo FACScalibur. As células tumorais que dão origem ao extrato tumoral são provenientes de melanomas caninos submetidos à digestão por colagenase e posteriormente congelados à -800 C na presença de soro fetal bovino e DMSO; o lisado tumoral é obtido submetendo-se as células tumorais a ciclos de congelamento com nitrogênio líquido e descongelamento, seguida por sonicação; a quantificação de proteína obtida no extrato é dosada com o método Bradford; no quinto dia de cultivo DCs (DC imaturas) são pulsadas com diferentes quantidades de lisado tumoral; no sexto dia é adicionado LPS para induzir maturação nas DCs e no sétimo dia é avaliada a imunofenotipagem. Até o momento foram obtidos aproximadamente 65% de DCs imaturas e os experimentos de imunofenotipagem após pulsar DCs com lisado tumoral se encontram em andamento.

### DETECÇÃO DE CIRCOVÍRUS E POLIOMAVÍRUS NO ESTADO DE SÃO PAULO

AZEVEDO, N.P.; GUIMARÃES, M.B.; FERREIRA, A.J.P.

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

O impacto de patógenos exóticos nas espécies nativas é um problema reconhecido; dentre as diversas doenças preocupantes em aves de cativeiro, a circovirose e a poliomavirose estão entre as mais importantes. Por serem doenças virais persistentes, com elevada mortalidade e morbidade, são extremamente perigosas tanto para psitacídeos de cativeiro como para os de vida livre. Estudos sobre a ocorrência destes agentes em aves de cativeiro e vida livre foram realizados em várias partes do mundo, entretanto, pouco se sabe sobre estes vírus na América do Sul. O circovírus de psitacídeo é o causador da doença do bico e das penas de psitacídeos (BFV), caracterizado pela distrofia simétrica das penas e pela imunossupressão. O poliomavírus (APV) causa uma doença semelhante à BFD, com alteração em penas, entretanto, outros sinais clínicos como a hemorragia subcutânea são comumente encontrados nesta patologia. Os dois patógenos infectar simultaneamente um mesmo hospedeiro. Apesar de afetarem psitacídeos, poucos estudos sobre estes agentes foram realizados no Brasil. O presente trabalho empregou a técnica de PCR, para detectar circovírus e poliomavírus em amostras biológicas de psitacídeos de cativeiro no Brasil. Foram examinados 120 animais, pertencentes a 23 espécies distintas, com sintomatologia compatível com APV e/ou BFDV. Foram encontradas 57 (47,5%) aves positivas, sendo que em 21 (17,5%) foi detectado o APV e em 41 (34,17%) o BFDV, distribuídos em 18 espécies de psitacídeos. Entre os animais positivos, cinco (8,62%) apresentaram infecção concomitante para os dois vírus. Os sinais clínicos observados nos animais positivos para circovírus foram apteria (n=19), automutilação (n=2), regurgitação (n=1), sinais neurológicos (n=11), apatia/anorexia (n=15) e óbito súbito (n=2). Nas aves positivas para poliomavírus, quatro apresentavam apteria, três automutilação, duas regurgitação, um sinal neurológico, vinte apatia/anorexia e um óbito súbito sem ocorrência de sinais clínicos. Os animais com infecção concomitante por circovírus e poliomavírus apresentavam: automutilação (n=2), apteria (n=3), apatia/anorexia severa (n=2) e sinais neurológicos (n=1). A detecção de APV e BFDV caracteriza o registro da ocorrência de ambos os vírus em psitacídeos de cativeiro no Brasil, tanto em espécies exóticas como em espécies nativas. Os sinais clínicos mais observados nas aves positivas para APV foram anorexia e/ou apatia, demonstrando que as manifestações clínicas da doença são inespecíficas e está é provavelmente a razão deste vírus ainda não ter sido estudado no Brasil. Também deve ser considerada a dificuldade para ser firmado o diagnóstico da doença quando não há outro agente associado. A presença de anemia em uma ave da espécie *Amazona aestiva* é um possível sinal clínico a ser considerado para a infecção por APV.

## EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO REPETIDA DE METILFENIDATO NO INÍCIO DA LACTAÇÃO NA ATIVIDADE GERAL DE RATAS E NOS NÍVEIS DE MONOAMINAS CENTRAIS APÓS DESAFIO COM A MESMA DROGA AO TÉRMINO DA LACTAÇÃO

PONCHIO, R.A.<sup>1</sup>; TEODORO, V, E.<sup>1</sup>; FLORIO, J.C.<sup>2</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N.<sup>2</sup>; BERNARDI, M.M.<sup>1,2</sup>

1 Universidade Federal do ABC, Centro de Matemática, Computação e Cognição. 2 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** o metilfenidato (MFD) é uma anfetamina não estimulante empregada já há algum tempo no tratamento do Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). Tem sido observado que após uma exposição repetida a psicoestimulantes há um progressivo e persistente aumento na hiperatividade induzida por estas drogas, ou seja, sensibilização. O presente trabalho investigou se a administração repetida de MFD na fase inicial da lactação induziria a sensibilização à mesma droga após a lactação por meio da atividade geral observada em campo aberto e da avaliação dos níveis estriatais de monoaminas. **Material e métodos:** camundongos fêmeas foram cruzadas com machos e do segundo ao oitavo dia da lactação foram tratadas uma vez ao dia com 10 mg/kg de MFD ou solução salina a 0,9%. As camundongas foram pesadas durante o tratamento e foi calculado o seu ganho de peso. No desmame, as camundongas dos dois grupos foram pesadas e receberam uma dose adicional de MFD. Duas horas depois foram observadas em campo aberto para medida de sua atividade geral e uma hora após este procedimento os seus estriados foram isolados e os níveis de monoaminas foram avaliados por HPLC. **Resultados e discussão:** com relação ao grupo controle: 1) o peso corporal das ratas após o desmame não foi modificado; 2) na atividade geral houve redução da frequência de locomoção e aumento na duração de imobilidade; 3) nos níveis de neurotransmissores estriatais foi observada a redução nos níveis de serotonina e seu metabólito; 4) não foram constatadas alterações nos níveis de dopamina e noradrenalina bem como de seus metabólitos. O tratamento com MFD no início da lactação associado a um desafio com a mesma droga reduziu a atividade geral de camundongos e dos níveis de serotonina e seu metabólito ao desmame indicando o desenvolvimento de sensibilização. **Conclusão:** a administração repetida de MFD no início da lactação promove sensibilização das fêmeas a uma dose desafio da mesma droga.

## PARTICIPAÇÃO DA BRADICININA, TAQUICININAS E RECEPTORES PURINÉRGICOS NA HIPERALGESIA INDUZIDA PELO CONTEÚDO DE SECREÇÃO PLAQUETÁRIA

LELLIS, T.B.; CARRILHO, J.M.; SILVA, E.A.; SANTORO, M.L.; GIORGI, R. Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Brasil.

**Introdução:** a injeção intraplantar (i.pl.) do conteúdo de secreção plaquetária (CSP) ou plaquetas íntegras induzem a hiperálgia em ratos avaliados pelo teste de pressão de pata, o que sugere que as plaquetas estão envolvidas na gênese da dor inflamatória. Com base nesses resultados, têm sido avaliados os mecanismos envolvidos na hiperálgia induzida pelo CSP. Já foi determinado, que os prostanoídes e os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -adrenérgicos, mas não a serotonina, estão envolvidos na mediação do efeito acarretado pelo CSP. **Objetivos:** no presente trabalho foi investigada a participação da bradicinina, das taquicinas e de receptores purinérgicos na hiperálgia induzida pelo CSP. **Métodos:** a hiperálgia foi avaliada em ratos Wistar machos submetidos ao teste de pressão de pata após a injeção i.pl. de CSP (50  $\mu$ l), na concentração equivalente à 200x10<sup>9</sup> plaquetas/L e o limiar de dor foi avaliado após 1, 2 e 4h após o tratamento (CEUAIB 0110813). A participação da bradicinina no efeito hiperálgico induzido pelo CSP foi investigada pelo pré-tratamento dos animais com Lys-(des-Arg<sup>9</sup>, Leu<sup>8</sup>) (antagonista de receptor B<sub>1</sub> de bradicinina, 30  $\mu$ g/pata, i.pl.) e bradyzide (antagonista de receptor B<sub>2</sub> de bradicinina, 15  $\mu$ g/pata, i.pl.). O envolvimento das taquicinas foi avaliado com as drogas GR82334 (antagonista de receptor NK<sub>1</sub>, 1,4  $\mu$ g/pata, i.pl.) e GR94800 (antagonista do receptor NK<sub>2</sub>, 0,9  $\mu$ g/pata, i.pl.). A droga A-317491 (antagonista dos receptores P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> e P<sub>2</sub>X<sub>2/3</sub>, 60  $\mu$ g/pata, i.pl.) foi empregada para a investigação da participação de receptores purinérgicos. **Resultados e discussão:** a hiperálgia induzida pelo CSP foi revertida pelo pré-tratamento dos animais com os antagonistas dos receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina, dos receptores NK<sub>1</sub> e NK<sub>2</sub> de taquicinas e com o antagonista de receptores purinérgicos P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> e P<sub>2</sub>X<sub>2/3</sub>, demonstrando que a bradicinina, as taquicinas e os receptores purinérgicos medeiam este efeito. Visto que a substância P (SP), o principal agonista do receptor NK<sub>1</sub>, sensibiliza receptores purinérgicos P<sub>2</sub>X<sub>3</sub>, pela ativação de NK<sub>1</sub>, é possível que haja uma conexão entre SP e receptores purinérgicos nos mecanismos envolvidos na hiperálgia induzida pelo CSP. As plaquetas não só são ativadas pela SP, como também possuem uma substância similar a SP. Assim, pode se aventar que a SP desempenhe um papel relevante na gênese da dor inflamatória induzida pelo CSP. **Conclusão:** Considerando-se os dados obtidos pode-se sugerir que prostanoídes, receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos, receptores B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> de bradicinina, receptores P<sub>2</sub>X<sub>3</sub> e P<sub>2</sub>X<sub>2/3</sub> purinérgicos e taquicinas medeiam a hiperálgia induzida pelo CSP. **Apoio financeiro:** PIBIC/CNPq, FAPESP (Proc: 2012/24621-1) e Fundação Butantã.

## VENCEDORES DO PRÊMIO DE MELHOR RESUMO - CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA – MEDICINA VETERINÁRIA

### 1º LUGAR

#### ESTUDO RETROSPECTIVO DA OCORRÊNCIA DE CARDIOPATIAS CONGÊNITAS DIAGNOSTICADAS EM CÃES

UMBELINO, R. M.<sup>1</sup>; LARSSON, M. H. M. A.<sup>2</sup>

1. Graduanda - FMVZ/USP. 2. Professora Doutora do Departamento de Clínica Médica – FMVZ/USP.

As doenças cardíacas congênitas (DCCs) são a causa principal de morbidade e mortalidade cardíaca em animais jovens. Idade, sexo e raça devem ser considerados quando da avaliação de animais com DCCs. O conhecimento da prevalência das afecções cardíacas em cães é de fundamental importância para o clínico de pequenos animais, auxiliando na formulação de diagnósticos diferenciais e no estabelecimento de um plano terapêutico adequado. Como a ocorrência de cardiopatias congênitas é variável de acordo com o país torna-se necessário o conhecimento da casuística nacional desta patologia. O presente trabalho efetuou uma análise da ocorrência das DCCs atendidas pelo Serviço de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica/HOVET-USP, considerando as variáveis raça, sexo e idade. O estudo retrospectivo foi realizado consultando-se as fichas de atendimento diário do Serviço de Cardiologia do Departamento de Clínica Médica/HOVET-USP, com a finalidade de resgatar os prontuários dos animais diagnosticados com DCCs no período de 2006 a 2013. Os dados foram tabulados e as frequências calculadas, para permitir a realização de uma estatística descritiva das DCCs mais frequentes em cães. Durante o período de estudo, 78 animais tiveram diagnóstico confirmado de cardiopatia congênita por meio do exame ecodopplercardiográfico. Desses, 73 animais (93,58%) apresentavam padrão racial definido e apenas cinco animais (6,42%) não tinham padrão racial definido. Considerando os 78 animais em estudo, com e sem definição racial, 50 animais (64,1%) eram fêmeas e 28 animais (35,69%) machos. Com relação ao padrão racial, foi observado que a raça Pastor Alemão foi a mais acometida (14,10%), seguida por Poodle (11,53%) e Yorkshire (10,25%). Neste estudo, 85 diagnósticos foram constatados. Dentre todas as doenças, a persistência do ducto arterioso (PDA) foi a mais frequente (47,05%), seguida da estenose subaórtica (ES) (15,29%), estenose pulmonar (EP) (10,58%) e estenose aórtica (EA) (8,43%). As DCCs foram mais frequentes em animais com menos de 12 meses (44,87%). Entretanto, também houve casos em animais de faixa etária mais avançada, o mais idoso tinha 13 anos. As DCC são mais frequentemente diagnosticadas em animais com padrão racial definido. As raças mais acometidas foram Pastor Alemão, Poodle e Yorkshire. Dentre todas as DCCs, a PDA foi a mais comum. As fêmeas foram as mais acometidas. As anomalias congênitas predominaram em animais com menos de 12 meses de idade. **Apoio financeiro:** FAPESP (processo n. 2013/13338-0).

### 2º LUGAR

#### AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DE ACARÁS (*GEOPHAGUS BRASILIENSIS*) COMO BIOMARCADOR DE POLUIÇÃO AMBIENTAL DA REPRESA BILLINGS

LÓPEZ, A.C.C.<sup>1</sup>; PAIVA, V.L.G.S.<sup>1</sup>; HELD, B.<sup>2</sup>; QUINAGLIA, G.A.<sup>2</sup>; SÁ, L.R.M.<sup>1</sup>

1. Laboratório de Gastroenterologia Experimental e Comparada e Patologia Ambiental, Departamento de Patologia, FMVZ-USP; 2. Setor de Análises Toxicológicas, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo.

**Introdução:** a água é um recurso natural essencial para a vida na Terra. Além de ser fundamental ecologicamente, é utilizada com fins econômicos como abastecimento para a humanidade e produção industrial e agrícola, influenciando diretamente a tomada de decisões políticas, econômicas e sociais. O peixe acumula substâncias químicas pela ingestão de alimento contaminado ou por contato pelas suas superfícies respiratórias com a água contaminada. O presente trabalho efetuou a análise macroscópica de peixes acarás (*Geophagus brasiliensis*), capturados em diferentes pontos do reservatório de água Billings, visando a sua utilização como bioindicadores dos níveis de poluição do ambiente de modo a subsidiar políticas públicas de monitoramento ambiental.

**Materiais e métodos:** foram avaliados 50 acarás (*G. brasiliensis*) machos, provenientes de cinco pontos de coleta do reservatório Billings, dez animais por ponto, selecionados aleatoriamente e coletados no período de março e abril de 2014. A coleta foi efetuada pela CETESB. Os animais chegaram mortos para a realização do exame macroscópico. **Resultados:** a média e desvio padrão do peso em gramas dos peixes foi de 140,24± 50,30, os dados biométricos expressos em centímetros foram: comprimento total médio 18,546± 2,182, e comprimento padrão médio 14,778± 2,393. Quanto à condição corpórea, 62% dos animais apresentaram condição corpórea adequada com depósitos de gordura intracelomática e 30% condição de sobrepeso com grandes depósitos de gordura, enquanto 2% foram considerados magros. Quanto aos órgãos analisados, 34% dos peixes apresentaram hepatomegalia e 58% coloração amarela e friável do fígado. Quanto ao baço, apenas 12% apresentaram esplenomegalia e 34% tinham a sua coloração alterada apresentando-se com a tonalidade variando de vermelho escuro a enegrecido. Dentre as brânquias examinadas, 6% dos animais apresentaram muco recobrimo os arcos. Os demais órgãos investigados: genitais, trato gastrointestinal, coração e rins não apresentaram alterações. **Conclusão:** a análise macroscópica dos acarás examinados mostrou que a maioria dos peixes apresenta condição corpórea adequada, mas com esteatose que pode ser indicativo de condição ambiental desfavorável. O estudo microscópico futuro dos órgãos poderá auxiliar na avaliação desta espécie como bioindicador da poluição ambiental na Billings.

**Apoio Financeiro:** Bolsista do CNPq-Brasil, FEHIDRO – AT 603.

**3º LUGAR****EFEITOS DE NORADRENALINA E CORTICOSTERONA IN VITRO SOBRE A ATIVIDADE DE LINFÓCITOS T DE GALINHAS SPF (PROJETO)**

OLIVEIRA, N. G.; MASSOCO, C.O.; QUINTEIRO-FILHO, W. M.

Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução:** as interações entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI) já estão bem estabelecidas. Sabe-se que o estresse ativa o SNC que, assim, modifica a função imune, diminuindo a resistência a infecções. Grande parte da influência do SNC sobre o SI é exercida por dois mecanismos principais: 1) via eixo hipotálamo-hipófise ou pituitária-adrenal (HPA), com liberação de glicocorticoides e, 2) via sistema nervoso autônomo simpático, com liberação de adrenalina e noradrenalina (NE). Sabe-se que os linfócitos T apresentam receptores para glicocorticoides e noradrenalina (receptores  $\beta$  e  $\alpha$  adrenérgicos) e que são modulados por essas duas substâncias. Diante disto, o presente projeto pretende dar continuidade à linha de pesquisa em neuroimunomodulação em aves, estudando *in vitro* os efeitos da noradrenalina e da corticosterona sobre a fenotipagem e proliferação de linfócitos T advindos do sangue periférico de galinhas SPF. **Objetivo:** avaliar os efeitos *in vitro* da noradrenalina e da corticosterona sobre a atividade de linfócitos T de galinhas SPF, analisando a fenotipagem e a proliferação de linfócitos T. **Materiais e Métodos:** dez galinhas SPF de 21 dias de idade, alojadas em câmaras isoladas, serão submetidas a coletas de sangue da veia jugular para posterior obtenção dos linfócitos T. As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) heparinizado serão purificadas por centrifugação de gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS, densidade 1077 g/ml. PBMC e serão marcadas com CFSE com o CellTrace™ CFSE kit. Após lavagem, as células finais serão ressuspensas a uma concentração de  $1 \times 10^7$  cel/ml em meio Xvivo-15 completo. A proliferação dos linfócitos será avaliada após o estímulo *in vitro* com concanavalin A. Após análise da proliferação dos linfócitos T, as células serão incubadas com marcadores de membrana CD3+, CD4+, CD8+, TCR $\gamma\delta$ , CD28+ para fenotipagem em citômetro de fluxo. **Delineamento Experimental:** Experimento A: Os linfócitos T serão incubados com: I) Concanavalin A (Con A) 5  $\mu$ g/ml; II) Con A 5  $\mu$ g/ml e corticosterona em quatro concentrações diferentes: 0,01  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 0,25  $\mu$ g/ml ou 1  $\mu$ g/ml; III) Con A 5  $\mu$ g/ml e noradrenalina em quatro diferentes concentrações: 0,01  $\mu$ g/ml, 0,1  $\mu$ g/ml, 0,25  $\mu$ g/ml ou 1  $\mu$ g/ml; IV) Controle, linfócitos T em meio de cultura ausente de Con A, noradrenalina ou corticosterona. Após 3 horas de incubação a placa será lavada e os linfócitos serão colocados em um novo meio de cultura, sendo analisados após 120 horas de incubação. Experimento B: Os procedimentos serão semelhantes aos do experimento A, porém após 24 horas de incubação a placa será lavada e os linfócitos serão colocados em um novo meio de cultura, sendo analisados após 120 horas de incubação. **Apoio financeiro:** PIBIC-CNPQ, FAPESP.

**VENCEDORES DO PRÊMIO – CATEGORIA INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIÊNCIAS BIOLÓGICAS****1º LUGAR****AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MATERNO DE RATAS WISTAR EXPOSTAS À FLUOXETINA DURANTE O PERÍODO DE LACTAÇÃO**SANTORO, M.A.<sup>1</sup>; SPINOSA, H.S.<sup>2</sup>; RICCI, E.L.<sup>3</sup>

1 Aluna de iniciação científica pelo VPT. 2. Docente Departamento de Patologia de patologia- VPT. 3 Doutora em toxicologia pelo departamento de patologia – VPT

Os antidepressivos são medicamentos usados na espécie humana para o tratamento dos transtornos do humor, tais como os depressivos e os bipolares. Têm também indicação para utilização em quadros de agorafobia (situação na qual o indivíduo evita locais ou situações das quais seria difícil escapar), enurese (micção involuntária noturna), narcolepsia (dificuldade de a pessoa manter-se acordada), transtorno do pânico, transtorno obsessivo-compulsivo, dores crônicas, entre outros distúrbios. Dentre os antidepressivos mais usados na atualidade, tanto em seres humanos, como em animais, a fluoxetina é considerada como causadora de poucos efeitos colaterais. Esse medicamento faz parte do grupo de antidepressivos considerados da terceira geração, que são inibidores seletivos da captação da serotonina. Considerando-se a existência de poucos estudos sobre os efeitos neurocomportamentais desse antidepressivo, o presente trabalho foi delineado para, avaliar as possíveis alterações no comportamento materno de ratas lactantes expostas à fluoxetina. Deste modo, 24 ratas Wistar prenhes foram separadas em quatro grupos (N=6): o grupo controle que recebeu por gavagem água (1 ml/kg) e três grupos experimentais que receberam por gavagem 1, 10 e 20 mg/kg de fluoxetina (isto é, a dose terapêutica, dez e vinte vezes a dose terapêutica), do 1º ao 21º dia da lactação. A avaliação do comportamento materno (CM) foi realizada no 5º dia de lactação, período no qual o CM apresenta sua intensidade máxima. As mães foram privadas de seus filhotes uma hora antes do início do teste e após 60 minutos da separação da mãe/filhotes, teve o início do teste propriamente dito, colocando-se cada um dos oito filhotes em posições opostas na caixa moradia, sendo então reintroduzida a rata. Os parâmetros avaliados foram: tempo de latência para o recolhimento dos quatro primeiros filhotes, tempo de latência para o início da amamentação e o número total de filhotes recolhidos pela mãe ao final do experimento. Os resultados mostraram que as mães do grupo tratado com 10 mg/kg tiveram aumento significativo no tempo de latência para recuperação dos filhotes. Além disso, as mães tratadas com 1, 10 e 20 mg/kg apresentaram aumento significativo no tempo de latência para o início da amamentação e as mães dos grupos de 1 e de 10 mg/kg apresentaram redução significativa no número total de filhotes recolhidos ao final do experimento com relação ao grupo controle. Esses resultados sugerem que à exposição ao antidepressivo promoveu prejuízo motor nos animais, principalmente na dose intermediária de 10 mg/kg. Ratas lactantes tratadas com o antidepressivo fluoxetina apresentaram efeitos colaterais com prejuízo dos seus comportamentos maternos.

**2º LUGAR****CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO CAMUNDONGO MUTANTE ESPONTÂNEO TREMOR UTILIZANDO UMA BATERIA DE TESTES COMPORTAMENTAIS (PROJETO EM ANDAMENTO)**

GARCIA GOMES, M.S.A.1; MANES, M.1; BERNARDI, M.M.2; MASSIRONI, S.M.G.3; MORI, C.M.C.1

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2. Universidade Paulista – UNIP. 3. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** a mutação espontânea tremor (tr), autossômica recessiva, foi observada na colônia de camundongos Swiss do Biotério do Departamento de Patologia da FMVZ/USP causando tremores, ataxia e convulsões. Na análise histopatológica, utilizando-se a coloração de Luxol Fast Blue foi evidenciada a deficiência de mielina principalmente nas meninges e camada molecular do cerebelo. Posteriormente, foram realizados dez retrocruzamentos com a linhagem C57BL/6 para mudança do fundo genético. Resultados preliminares do mapeamento genético, efetuado com marcadores microssatélites, indicaram que a mutação tremor está situada no cromossomo 14. Com o objetivo de caracterizar o fenótipo dos mutantes tremor será utilizada uma bateria de testes comportamentais visando observação do estado geral de saúde, dos reflexos neurológicos, das habilidades sensoriais e da função motora. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos machos com oito semanas de idade, dos quais oito mutantes tremor e oito C57BL/6 que não apresentavam a mutação para o grupo controle. A caracterização fenotípica dos camundongos mutantes abrangeu a avaliação geral do fenótipo baseando-se em uma bateria de testes comportamentais. Inicialmente, os testes foram realizados no campo aberto e ordenados por parâmetro avaliado, na seguinte sequência: 1) atividade geral dos animais e sistema sensorial: frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, aperto de cauda, reflexo corneal e resposta ao toque; 2) testes psicomotores: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal e força de agarrar; 3) avaliação do sistema nervoso central e autônomo: tremores, convulsões, cauda em pé, sedação, anestesia, ataxia, ptose, lacrimação, micção e defecação. **Resultados e discussão:** em relação aos camundongos C57BL/6, nos mutantes houve incremento significativo nos tremores. Observou-se ainda, aumento na ataxia, e também uma maior quantidade de animais que andavam com a cauda em pé, que pode ser um mecanismo compensatório à sua ataxia para auxiliar com o déficit de equilíbrio. Ainda, foi observada a redução na motilidade e nas frequências de levantar e *grooming*. Foi aventada a hipótese de que o aumento do tremor, parâmetro ligado ao sistema nervoso central, tenha sido responsável pela redução nos parâmetros psicomotores e da motilidade. Visando à validação do modelo animal, a partir desses resultados iniciais serão selecionados testes comportamentais mais específicos que auxiliarão na caracterização do fenótipo da mutação. **Conclusão:** Concluiu-se que o mutante tremor apresenta prejuízos de origem no sistema nervoso central, possivelmente gerados pela falta de mielina, que afetam o seu desempenho motor.

**3º LUGAR****FENOTIPAGEM COMPORTAMENTAL DO CAMUNDONGO MUTANTE EQUILÍBRIO**

MANES, M.1; GOMES, M.S.A.G.1; BERNARDI, M.M.2; MASSIRONI, S.M.G.3; MORI, C.M.C.1

1. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 2. Universidade Paulista – UNIP. 3. Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** o camundongo mutante recessivo denominado equilíbrio (eqlb), que apresenta deficiência de equilíbrio e incoordenação motora, foi originado em um projeto de mutagenese que empregou o agente químico N-Ethyl-N-Nitrosourea (ENU). Na sua análise histopatológica foi constatado que apresentavam a formação anormal das camadas celulares do cerebelo, com desorganização da camada de células de Purkinje e espessamento da camada granular externa. O seu mapeamento genético identificou a mutação no gene NADPH oxidase 3 (Nox3), cromossomo 17, descrito como responsável por defeitos vestibulares e na formação das otocônias. A caracterização fenotípica dos mutantes equilíbrio abrangeu a avaliação geral do seu fenótipo, efetuada com uma bateria de testes comportamentais destinados a avaliação das condições: estado geral de saúde, reflexos neurológicos, habilidades sensoriais e função motora. **Material e métodos:** foram utilizados camundongos machos com oito semanas de idade, dos quais 12 mutantes equilíbrio e 12 camundongos BALB/c do grupo controle. A caracterização fenotípica dos camundongos mutantes abrangeu a avaliação geral do fenótipo baseando-se em uma bateria de testes comportamentais. Inicialmente, os testes foram realizados no campo aberto e ordenados por parâmetro avaliado, na seguinte sequência: 1) atividade geral dos animais e sistema sensorial: frêmito vocal, irritabilidade, reflexo auricular, aperto de cauda, reflexo corneal e resposta ao toque; 2) testes psicomotores: contorção, trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus corporal e força de agarrar; 3) avaliação do sistema nervoso central e autônomo: tremores, convulsões, cauda em pé, sedação, anestesia, ataxia, ptose, lacrimação, micção e defecação. **Resultados e discussão:** em relação aos camundongos BALB/c, os camundongos equilíbrio apresentaram aumento de queda do trem posterior e redução no reflexo de endireitamento, irritabilidade, resposta ao toque, da defecação e na frequência de levantar. Nos camundongos mutantes equilíbrio, o aumento da queda do trem posterior e redução no reflexo de endireitamento apontam para prejuízo do sistema psicomotor enquanto que a redução na resposta ao toque e da irritabilidade mostram que os mesmos apresentam redução no sistema sensorial. A redução da frequência de levantar provavelmente é consequência da dificuldade motora dos camundongos deste grupo. Além disto, a redução na defecação indicaria menor ativação do sistema nervoso autônomo. Visando à validação do modelo animal, a partir desses resultados iniciais serão selecionados testes comportamentais mais específicos que auxiliarão na caracterização do fenótipo da mutação. **Conclusões:** Conclui-se então que os camundongos mutantes do grupo equilíbrio apresentam prejuízos motores e sensoriais. **Apoio Financeiro:** CNPq.

## VENCEDORES DO PRÊMIO – CATEGORIA DOUTORADO MEDICINA VETERINÁRIA

### 1º LUGAR

#### CAÇA ILEGAL DE QUATIS (*NASUA NASUA*, LINEU, 1766) – A CONTRIBUIÇÃO DA PATOLOGIA VETERINÁRIA FORENSE NO ESTUDO DE DOIS CASOS DO SERVIÇO DE PATOLOGIA ANIMAL DA FMVZ-USP

SIQUEIRA, A.1; SALVAGNI, F.A.1; AMPUERO, F.2; MESQUITA, R.G.2; MAIORKA, P.C.3

1-Doutoranda - Programa de Patologia Experimental e Comparada - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

2-Residente - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

3-Professor Associado - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

**Introdução:** o quati (*Nasua nasua*) é um carnívoro da família Procyonidae, amplamente distribuído pela América do Sul. Apresenta baixo risco de extinção segundo a Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES). A caça no Brasil é ilegal, conforme dispõe o artigo 29 da Lei Federal n. 9605/1998, e incorre em pena que varia de seis meses a um ano, com multa. Em casos de crimes contra animais, a necropsia forense é crucial como elemento da investigação policial. **Relato de caso:** foram trazidos pela Polícia Ambiental do Estado de São Paulo ao Serviço de Patologia Animal da FMVZ-USP para necropsia documentada dois quatis (*Nasua nasua*), machos, adultos, encontrados no quintal da casa de um foragido da Justiça, suspeito de ter atirado nos animais com um rifle, encontrado no local. Devido a suspeita de lesão por agente perfurocontundente (projétil), os animais foram radiografados. O exame radiográfico revelou que o animal 1 possuía projéteis balísticos localizados no pescoço e membro torácico esquerdo; o animal 2 possuía projéteis balísticos dispersos pelos membros, abdome e coluna vertebral, além de fratura da calota craniana. Na necropsia, no animal 1 havia laceração da musculatura do membro torácico esquerdo associada a projéteis balísticos metálicos de 0,4 cm de diâmetro. Na região cervical ventral havia áreas de laceração muscular e múltiplas fraturas de vértebras associadas a projéteis balísticos. No animal 2, além das lesões associadas aos projéteis, na região crânio-encefálica havia uma lesão corto-contusa, e fratura transversal completa que se estendia do osso temporal direito ao osso temporal esquerdo, com exposição da massa encefálica. Todo o procedimento foi fotografado e os projéteis foram recolhidos e entregues à Polícia. **Discussão:** a realização da necropsia forense é crucial nos casos de suspeitas de crimes contra animais, o que foi o caso desta caça ilegal dos quatis. A radiografia das carcaças é preconizada nestes casos, pois auxilia na localização dos projéteis, os quais foram todos recuperados. Além disso, verificou-se que, além das lesões perfurocontusas, havia uma lesão cortocontusa, não associada aos projéteis, o que pode indicar que o animal pode ter sofrido um trauma. Portanto, além de infringir o artigo 29 da Lei 9605/1998, houve infração do artigo 32 da mesma lei, que trata de crueldade contra animais. Tais fatos serão verificados por um perito criminal, já que o relatório de necropsia deve se ater à descrição dos achados necroscópicos. **Conclusão:** os achados da necropsia levaram à conclusão de que os quatis morreram por consequência das lesões causadas pelos projéteis balísticos, que eram compatíveis com a arma encontrada na cena do crime. **Apoio financeiro:** CNPq (Processo número 141973/2012-9), FAPESP (Processo número 2012/23645-4), CAPES.

### 2º LUGAR

#### CONTRIBUIÇÃO DA MEDICINA VETERINÁRIA LEGAL EM CASO DE MORTE DE ANIMAIS EM MASSA

SALVAGNI, F.A.1; DE SIQUEIRA, A.1; FUKUSHIMA, A.R.1; LANDI, M.F.A.2; PONGE-FERREIRA, H.3; MAIORKA, P.C.4

1. Doutorando (a) em Patologia Experimental e Comparada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 2. Médica veterinária autônoma.

3. Médica veterinária especializada em Perícias Veterinárias pelo IMESC.

4. Professor Doutor Associado do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** trinta e sete animais, dentre cães e gatos supostamente encaminhados à adoção, foram encontrados mortos em sacos de lixo em São Paulo/SP. O caso recebeu grande atenção da mídia e o Boletim de Ocorrência foi lavrado sob a lei 9605/98, artigo 32 relativo a maus-tratos contra animais. Os corpos foram encaminhados ao Serviço de Patologia Animal (SPA) da FMVZ-USP para determinação da causa de morte. O presente trabalho visa ressaltar o papel do médico veterinário e a importância da necropsia, da patologia e da toxicologia forenses em casos de óbitos de animais com potencial jurídico e/ou com grande atenção da mídia. **Relato de caso:** dos 37 animais recebidos para necropsia pelo SPA da FMVZ-USP, 33 eram gatos e quatro eram cães, todos sem raça definida e com idades variadas. Para fins de preservação da cadeia de custódia, os animais foram fotografados ainda no interior dos sacos de lixo e identificados com um número individual. As necropsias foram realizadas com o emprego das técnicas preconizadas para animais de pequeno porte, com documentação fotográfica de identificação por animal e das respectivas lesões encontradas. Os corpos foram submetidos a radiografias para pesquisa de luxações e fraturas. Amostras de sangue cardíaco foram colhidas para pesquisa de cetamina e xilazina utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) com coluna capilar DB-5 30 m, realizada no Núcleo de Toxicologia Forense do IML de São Paulo/SP. Foi aplicada técnica de extração modificada QuEChERS para a separação e quantificação da cetamina e xilazina. À necropsia, os animais apresentaram perfurações únicas ou múltiplas no tórax, atingindo o coração e/ou grandes vasos, resultando em hemopericárdio e hemotórax graves. A análise toxicológica dos coágulos cardíacos foi positiva para quetamina, uma droga de uso restrito. A causa da morte foi por colapso circulatório e tamponamento cardíaco, e claramente não natural. Não havia sinais de fraturas ou luxações. **Discussão:** Os achados das necropsias confirmaram a causa de morte dos animais e refutaram as suspeitas populares e da mídia a respeito da venda ilegal de sangue ou de “rituais de magia negra”. A acusada havia se responsabilizado pela morte de apenas uma pequena parte dos animais encontrados e que os mesmos estavam fatalmente doentes, porém a necropsia revelou que todos os 37 animais haviam sido mortos da mesma forma e eram previamente saudáveis. A acusada foi multada pela morte dos 37 animais. **Conclusão:** a demanda pela medicina veterinária legal é crescente e a formação de profissionais na área aliada à troca de conhecimentos com as ciências forenses humanas é essencial.

**Apoio Financeiro:** FAPESP, CAPES e CNPq.

**3º LUGAR****DETECÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DO VÍRUS DA HEPATITE E EM FÍGADOS DE SUÍNOS NATURALMENTE INFECTADOS**

DE SOUZA, A.; MALHEIROS, A.; SOARES, M.; GOUVÊA, M.G.; PINHO, J. ; PEREIRA, W.; SÁ, L.R.M.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** suínos são a principal fonte de infecção dos genótipos 3 e 4 do vírus da hepatite E (Hepatitis E virus, HEV) para humanos. O HEV é um RNA vírus considerado como patógeno emergente e causador de hepatite aguda e crônica, em humanos, em regiões geográficas tidas como não-endêmicas para o vírus. O presente empregou a técnica de imunohistoquímica (IHQ), para detectar antígenos do HEV em amostras de fígados de suínos abatidos para consumo humano e naturalmente infectados pelo vírus. **Material e métodos:** fígados de seis suínos, sem alterações macroscópicas, positivos para o HEV-RNA por nested RT-PCR, confirmados por sequenciamento nucleotídico e análise filogenética, foram submetidos à detecção IHQ do HEV utilizando o anticorpo primário polyclonal rabbit Anti-Hepatitis E Virus ORF3 na diluição de 1:20. Os cortes foram avaliados em microscópio óptico quanto à presença do antígeno do HEV de acordo com a intensidade e distribuição, entre zonas e tipos celulares envolvidos. O critério de positividade estabelecido foi a imunomarcção intracitoplasmática da proteína da ORF3 (pORF3), de aspecto levemente granular com coloração castanho-dourado. **Resultados e discussão:** a detecção IHQ do HEV foi positiva somente em três dos seis animais examinados. Em um caso a imunomarcção de pORF3 foi observada com intensidade discreta no interior de hepatócitos íntegros e de células de Kupffer, com distribuição aleatória no parênquima hepático, enquanto que nos outros dois casos, a marcação foi discreta e no interior de células do epitélio biliar ou leucócitos nos espaços-porta. Não foram observadas marcações em células degeneradas e/ou necróticas. A inconsistência entre a detecção do HEV-RNA com a detecção IHQ da pORF3 pode estar relacionada a um período mais tardio de infecção, em que haveria uma diminuição do número de células positivas e/ou a uma baixa carga viral e de expressão da pORF3, que levariam a uma menor sensibilidade de detecção do HEV pela técnica de IHQ. **Conclusão:** A detecção IHQ da pORF3 pode ser aplicada como um instrumento de diagnóstico complementar para a detecção do HEV em amostras de fígado de suínos, bem como em estudos de patogenia da infecção pelo HEV. **Apoio financeiro:** O estudo foi parcialmente financiado por verba PROAP/CAPES.

**VENCEDORES DO PRÊMIO – CATEGORIA DOUTORADO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS****1º LUGAR****AMITRIPTYLINE: PROPHYLACTIC MODEL MODULATES DSS-COLITIS IN MICE**

NAMAZU, L. B.<sup>1</sup>; CALEFI, A. S.<sup>1</sup>; GIMENES D.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, R.<sup>2</sup>; COHN, D.W.<sup>4</sup>; LIMA, A.P.N.<sup>1</sup>; VITORETTI, L. B.<sup>1</sup>; DREWES, C. C.<sup>3</sup>; AMAYA, J.E.O.<sup>1</sup>; BORSOI, A.<sup>4</sup>; REIS-SILVA, T. M.<sup>1</sup>; MASSOCO, C.O.<sup>5</sup>; COSTA-PINTO, F. A.<sup>5</sup>

1. PhD- student, VPT-FMVZ-USP; 2. Master-student VPT FMVZ-USP; 3. PhD- student, - Laboratory Toxicology Department of Experimental-Clinical and Toxicological Analysis. Faculty of Pharmaceutical Sciences USP; 4. PhD- student, -Institute of Biomedical Sciences- USP; 5. PhD-VPT FMVZ-USP; 6. Prof. Doctor VPT-FMVZ-USP

**Introduction:** inflammatory bowel disease (IBD) in humans is a chronic disease of complex etiology that manifests as Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC). It involves an exacerbated immune reaction to the gut microbiota. The nervous system interacts with immunity in the gut in a bidirectional fashion. Inflammation is modulated by neural activity and may lead to emotional and psychological changes. Amitriptyline (AMT) is a commonly used antidepressant with known anti-inflammatory activities. **Objective:** It was hypothesized that antidepressants like amitriptyline could be considered as a prophylactic treatment and attenuation of development of IBD in mice. **Material and Methods:** C57BL/6 mice were housed in groups of five per cage with free access to food and water without treatment (Vehicle) or with Amitriptyline and Dextran Sulphate Sodium (AMT/DSS). The groups were Vehicle (1), Vehicle+DSS (2), Vehicle+DSS+AMT (3) and, Vehicle+AMT (4). The prophylactic model consisted of the AMT (200 µg/ml) administration p.o. for 14 days on animals in the groups 3 and 4. After 14 days animals in groups 2 and 3 received DSS (3,5%) for 5 days. The tissues were collected in the 19th experimental day. The circulating and colonic (proximal and distal) inflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha and IL-1 β) were quantified, and the neutrophilic inflammatory response was assessed by the myeloperoxidase (MPO) activity on colon (proximal and distal). This project was approved by the Ethics Committee on animal use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science- USP (Protocol 2999/2013). **Results:** the AMT prophylactic treatment was able to prevent the animal weight loss by the DSS induced colitis. Circulating IL-6 and TNF-alpha were reduced by the prophylactic AMT treatment associated with the decreased MPO activity in the proximal colon. **Conclusion:** the reduction in the DSS-colitis in mice induced by the AMT treatment, may lead a possible use of amitriptyline to reduce the IBD clinical signs in humans. **Financial support:** CAPES/ FAPESP.

## 2º LUGAR INFLUÊNCIA DA IDADE NA COGNIÇÃO E COMPORTAMENTO DE RATAS

SANDINI, T.M.<sup>1</sup>, REIS-SILVA, T.M.<sup>2</sup>, SPINOSA, H.S.<sup>3</sup>

1. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2. Departamento de Neurociência, Faculdade de Psicologia Universidade de São Paulo. 3. Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** o envelhecimento populacional é um grande desafio para as políticas públicas de saúde, pois afeta a funcionalidade do idoso, gerando repercussões sobre o aspecto comportamental e cognitivo. Sabe-se, que os modelos animais são fundamentais para a pesquisa, pois mimetizam algumas características de um estado patológico específico, favorecendo a sua compreensão e o desenvolvimento de terapias. O presente trabalho analisou comparativamente o perfil comportamental de ratas jovens e ratas que estavam entrando em um processo de envelhecimento natural. **Material e métodos:** foram empregadas ratas com três meses (n=10) e 12 meses de idade (n=10), as quais foram submetidas ao teste de campo aberto, labirinto em cruz elevado, caixa claro escuro e labirinto de Barnes. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ/USP sob protocolo nº 3047/2013. Resultados e discussão: foram observadas diferenças significantes entre os grupos em todos os testes comportamentais. No campo aberto houve diminuição na frequência de levantar (3,18±1,16) e grooming (1,33±0,33) nas ratas senescentes (p<0, 0001), porém não houve diferenças significantes na distância total percorrida. Com relação aos resultados do labirinto em cruz elevado, as ratas senescentes gastaram menos tempo (11,3±3,6; p<0,01) e tiveram menor número (1,0±0,23; p<0, 0001) de entrada nos braços abertos. Na caixa claro-escuro as ratas senescentes mostraram menor tempo no compartimento claro (37,92±10,6; p<0, 00001) e consequentemente maior tempo no escuro (267,1±7,8; p<0, 00001), bem como, menor número de cruzamentos (1,16±0,16, p<0, 00001), do que as ratas jovens. No labirinto de Barnes, houve pior desempenho na latência para encontrar a caixa de escape (119,3±33,2; p<0,01) e maior no número de erros (6,07±1,5; p<0,01) nas ratas senescentes. Os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado e na caixa claro-escuro sugerem a existência de aumento da ansiedade nas ratas senescentes, uma vez que, nos dois testes, as ratas apresentaram neofobia acentuada. Com relação ao labirinto de Barnes, os resultados mostraram diminuição no aprendizado, o que implica prejuízo da resposta cognitiva. **Conclusão:** Foram constatadas diferenças comportamentais significantes, demonstrando aumento da ansiedade e prejuízo cognitivo em ratas que estão iniciando o processo de senescência. Os resultados apresentados podem ser utilizados como modelo para a melhor compreensão da neurobiologia do envelhecimento natural. **Apoio financeiro:** CAPES

## 3º LUGAR REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO PROTEICA

SILVA, G.B.; TSUJITA, M.; HASTREITER, A.A.; BORELLI, P.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

**Introdução e objetivo:** a desnutrição proteica (DP) pode ocasionar alterações na matriz extracelular (MEC) em diferentes órgãos, conduzindo ao comprometimento das suas funções. No modelo murino de DP, tem sido investigadas alterações quantitativas na MEC da medula óssea (MO), principalmente de fibronectina (FN), na região subendosteal (local de fixação da célula-tronco/progenitora hemopoética-CTPH). No estroma da MO *in vitro*, também foram observadas variações quantitativas de FN, envolvidas com alterações do ciclo celular da CTPH e que podem estar associadas ao comprometimento da hemopoese. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são responsáveis pela degradação da MEC e estão envolvidas com a regulação da CTPH. Alterações nas MMPs e em seus inibidores TIMP1 e TIMP2, podem conduzir a modificações no microambiente hemopoético e, consequentemente, alterações na regulação da CTPH. A hipótese aventada é que as alterações da FN na DP podem decorrer, em parte, de alterações na expressão gênica da FN e ou a ação de MMP2 e MMP9. **Material e métodos:** camundongos C57Bl/6J, foram separados em dois grupos: controle (C) e desnutrido (D) recebendo, respectivamente, ração com 12% e 2 % de proteína por cinco semanas. Após este período os camundongos foram eutanasiados para a obtenção das células totais da MO para o estabelecimento, *in vitro*, do estroma (28 e 35 dias) aonde, foram avaliadas a atividade enzimática das MMP2 e MMP9, quantificação de TIMP1 e TIMP2 e determinação da FN por RT-PCR. **Resultados:** anteriormente, *in vitro* havia sido observada maior quantidade de FN no 28º dia e menor quantidade de FN 35º dia. Apesar disto não foram encontradas alterações na expressão do RNAm da FN entre grupos e momentos analisados, o que pode ser justificado pelo fato do RNAm de genes constitutivos terem uma vida média mais longa. No estroma do grupo D houve menor atividade de MMP2 nos dois momentos analisados, apesar desta diferença não ser significativa, o que justificaria a maior quantidade de FN no 28º dia do grupo D. No entanto não foram observadas diferenças quantitativas de TIMP2 entre grupos e momentos de análise. Já a atividade de MMP9 nos dois grupos analisados no 35º dia foi maior em relação ao 28º, apesar desta diferença não ser significativa. Corroborando com este achado foi encontrada menor quantidade de TIMP1 no 35º dia, o que pode explicar a maior quantidade de MMP9, visto que TIMP1 inibe MMP9. A menor quantidade de FN registrada no 35º dia do grupo D pode estar relacionada com a maior quantidade de MMP9. **Conclusão:** a DP conduz a alterações de MMPs 2 e 9 que estão envolvidas no processo de remodelamento da FN. Estes resultados podem justificar as alterações hematológicas causadas pela DP já relatadas. **Apoio financeiro:** FAPESP, CNPQ, CAPES.

## APRESENTAÇÃO ORAL - INICIAÇÃO CIENTÍFICA - MEDICINA VETERINÁRIA

### EFEITO DE DIFERENTES TIPOS DE CAMA NA REPRODUÇÃO DE CASAIS BALB/C

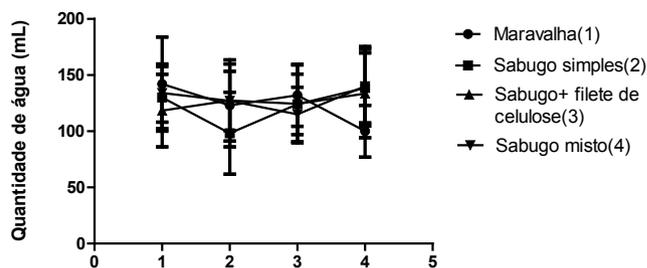
ALVES, S. P.<sup>1</sup> FALCONE, C.<sup>2</sup> NASCIMENTO, N.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina Veterinária Anhembi Morumbi.

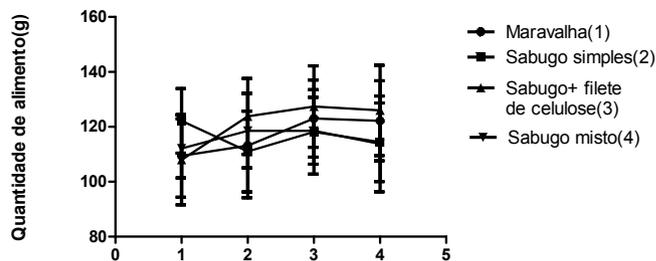
<sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). São Paulo- SP, Brasil.

**Introdução:** As pesquisas atuais buscam diferentes formas de proporcionar o bem-estar aos animais de laboratório. Esses resultados são muito importantes para que a homeostase seja alcançada, pois esta condição reflete diretamente nos resultados às substâncias testadas nas pesquisas [1, 4, 8].

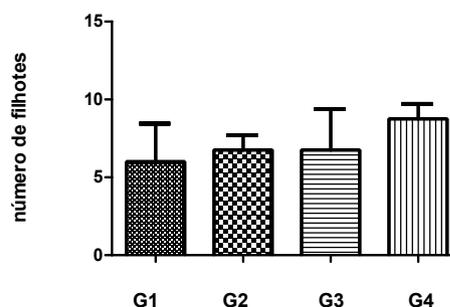
Um dos problemas observados na criação e manutenção de camundongos é a quantidade de amônia acumulada nas caixas ou isoladores, onde os animais são mantidos, podendo afetar o bem-estar, e interferir, por exemplo, na sua reprodução [1, 6]. Sabe-se que o tipo de cama interfere diretamente na absorção da urina e, conseqüentemente, na liberação da amônia. Desta forma, pesquisar diferentes tipos de camas, com o intuito de encontrar uma associação entre custos acessíveis e melhora na questão reprodutiva [2], seria importante, principalmente em animais de linhagem isogênica, como o Balb/C, que possuem baixa capacidade de reprodução [3, 4]. Neste contexto, esta pesquisa comparou a fisiologia reprodutiva de casais de camundongos da linhagem Balb/C mantidos em diferentes tipos de cama: G1) maravalha, G2) sabugo simples, G3) sabugo + filetes de celulose, G4) misto de dois tamanhos de sabugo de milho (1,8cm e 1,4cm). Os aspectos analisados foram: verificar se havia utilização do artefato de celulose; avaliar o peso, consumo de água e alimentação dos animais; comparar o desenvolvimento reprodutivo dos casais, acompanhando o número de filhotes e o seu peso ao desmame. **Material e métodos:** Foram utilizados 32 animais camundongos da linhagem Balb/C, sendo 16 fêmeas e 16 machos com idade aproximada de três meses de vida [3, 4, 7, 8], conforme aprovados pela CEUA/IPEN. Os casais foram formados de forma aleatória (Intemedino Group), e mantidos em estantes ventiladas (Alesco®) [1, 3, 4], compondo quatro grupos: G1) maravalha, G2) sabugo de milho tradicional, G3) sabugo de milho + filete de celulose e G4) sabugo de milho misto (1, 8cm e 1, 4cm). O peso dos filhotes do casal foi avaliado no intervalo de 21 a 28 dias [3, 4]. A ração e água foram oferecidos *ad libitum* e o consumo foi medido semanalmente [1, 4, 7]. Também foi registrado o número de filhotes [7, 8]. Os resultados foram analisados via software GraphPad Prism, pelo teste de Tukey, considerando significativos valores de  $p < 0.05$ . As trocas das camas foram efetuadas a cada sete dias para o G1 [1,4, 5] e a cada 15 dias para os G2, G3 e G4 [9, 10]. **Resultados:** Os resultados obtidos revelam a ausência de diferenças significativas, entre os grupos, com relação ao consumo de água, alimento e número de filhotes (Gráfico 1, 2, 3). Entretanto, houve diferença entre o peso de filhotes no G4 (sabugo misto) e o G3 (sabugo + filete de celulose). Esses resultados ocorrem devido à maior quantidade de absorção da amônia com a mistura dos tamanhos de sabugo, além do papel da celulose como fonte de bem-estar. Entretanto, são necessárias maiores pesquisas sobre essas características. É importante citar também que o artefato de celulose, no G3, foi utilizado pelos animais para a formação de ninho, sendo necessário aprofundar-se a afirmação, na questão do bem-estar.



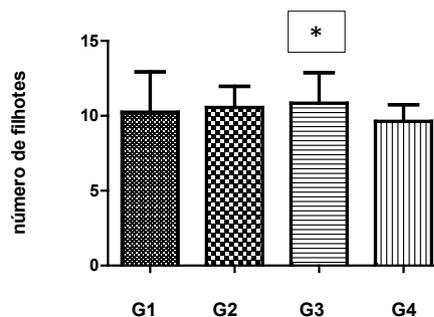
[1] Gráfico demonstrativo do consumo de água (mL)



[2] Gráfico demonstrativo do consumo de alimento(g)



[3] Gráfico demonstrativo do número de filhote por grupo



[4] Gráfico demonstrativo do peso (g) dos filhotes por grupo

**Conclusão:** Com base nos resultados obtidos foi constatada a existência de diferença significativa no peso dos filhotes entre o G4 (sabugo misto) e G3 (sabugo + filete de celulose). Além disso, os animais do G3 (sabugo + filete de celulose) utilizaram o artefato de celulose para formação de ninho, sendo importante aprofundar-se a pesquisa sobre essa característica, pois esse artefato parece estar atendendo às questões de bem-estar. **Agradecimentos:** Agradeço ao auxílio financeiro da Bolsa CNEN-PIB/BIC (Projeto 115546/2014-6) e ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-USP).

### Referências

Gaafar H, Girgis R, Hussein M, Elnemr F. 1992. The effect of ammonia on the respiratory nasal mucosa of mice- a histological and histochemical study. Acta Otolaryngol 112: 339 - 342.

Latham N, Mason G. 2004. From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implication in the laboratory. *Appl Anim Behav Sci* 86: 261 – 289.

M. Chorilli, D. C. Michelin, H. R.N. Salgado. 2007. Animais de laboratório: o camundongo.

Iturrian WB, Fink GB. 1968. Comparison of bedding material: habitat preference of pregnant mice and reproductive performance.

Daniel A Domer, Rebecca L Erickson, Joann M Petty, Valerie K Bergdall, and Judy M Hickman-Davis\*. 2012. Processing and Treatment of Corncob Bedding Affects Cage-Change Frequency for C57BL/6 Mice.

Kaliste-Korhonen, Satu Eskola Eila. 1999. Nesting material and number of females per cage: effects on mouse productivity in BALB/c, C57BL/6J, DBA/2 and NIH/S mice.

Thorne PS, Ulanova K, Yin M, Cohn R, Ares SJ, Jar, Zeld DC. 2005. End toxin exposure is a risk factor for asthma: the National Survey of End toxin in United States Housing

Green AR, Watches CM, Dimmers TG, Clark JM, Xing H. 2008. Development and application of a novel environmental preference chamber for assessing responses of laboratory mice to atmospheric ammonia.

Kawakami K, Shimosaki S, Tongu M, Kobayashi Y, Nabika T, Nomura M, Yamada T. 2007. Evaluation of bedding and nesting materials for laboratory mice by preference tests.

Rosenbaum MD, VandeWoude S, Johnson TE. 2009. Effects of cage-change frequency and bedding volume on mice and their microenvironment.

## ZINCO PREVINE COMPORTAMENTO DOENTIO INDUZIDO PELO LIPOPOLISSACARÍDEO APÓS DESAFIO ESTRESSOR EM RATOS

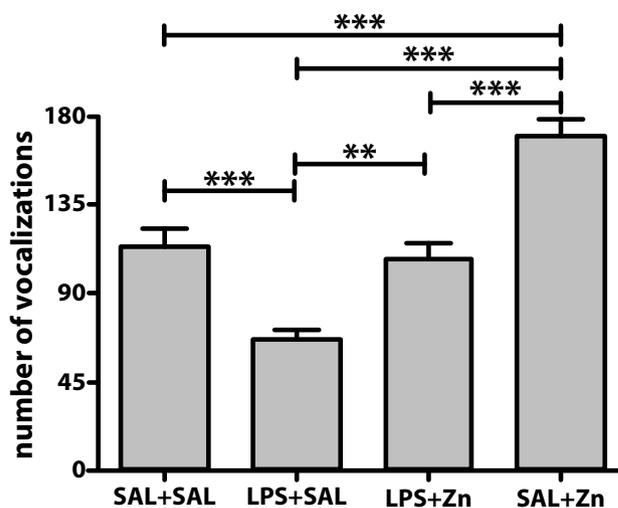
GALVÃO, M. C. <sup>1</sup>; REIS-SILVA, T. M. <sup>1</sup>; QUEIROZ-HAZARBASSANOV, N. <sup>1</sup>; BERNARDI, M. M. <sup>2</sup>; KIRSTEN, T. B. <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil. Email: mcg2804@gmail.com

<sup>2</sup> Patologia Ambiental e Experimental, Universidade Paulista, São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** O comportamento doentio (CD) é uma resposta comportamental e imune, específica e temporária, que ocorre em diversas espécies em diferentes processos inflamatórios/infecciosos [1-4]. É geralmente acompanhado por febre, prostração, diminuição da atividade exploratória, do comportamento social, alimentar e sexual, além de prejuízos cognitivos [1,5]. As alterações do CD são consideradas como estratégias orquestradas pelo hospedeiro para melhor lidar contra microorganismos invasores, cura rápida e redução da exposição do doente a predadores e contaminação de sua colônia [2,4]. Porém, o CD é considerado um estado motivacional modulado pelo contexto ambiental [6]. Por exemplo, se o animal estiver correndo risco de morte, ou engajado em lutas hierárquicas, o CD normalmente é momentaneamente interrompido para priorizar os comportamentos de luta ou fuga [6,7]. O lipopolissacarídeo (LPS) mimetiza infecções por bactérias Gram-negativas com a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) - $\alpha$  e interleucinas - $1\beta$  e -6 [8,9], e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) [10], sendo considerado um potente indutor de CD [11]. O zinco regula os sistemas imune e nervoso, sendo, inclusive, prescrito para o tratamento de gripe, infecções respiratórias e pneumonia [12-14], embora sem preocupações com intercorrências estressoras. Considerando que o CD pode ser expresso de maneira diferente em situações estressoras, no presente trabalho o CD foi induzido em ratos com administração de LPS e subsequentemente os animais foram expostos ao desafio estressor por contenção. O objetivo do trabalho foi verificar os efeitos do tratamento com zinco no CD de ratos estressados. **Material e Métodos:** Foram utilizados quarenta ratos Wistar machos adultos (FMVZ-USP, Protocolo n°3130/2013) separados em quatro grupos (n = 10): (1) SAL+SAL, salina estéril (0,2 ml/100

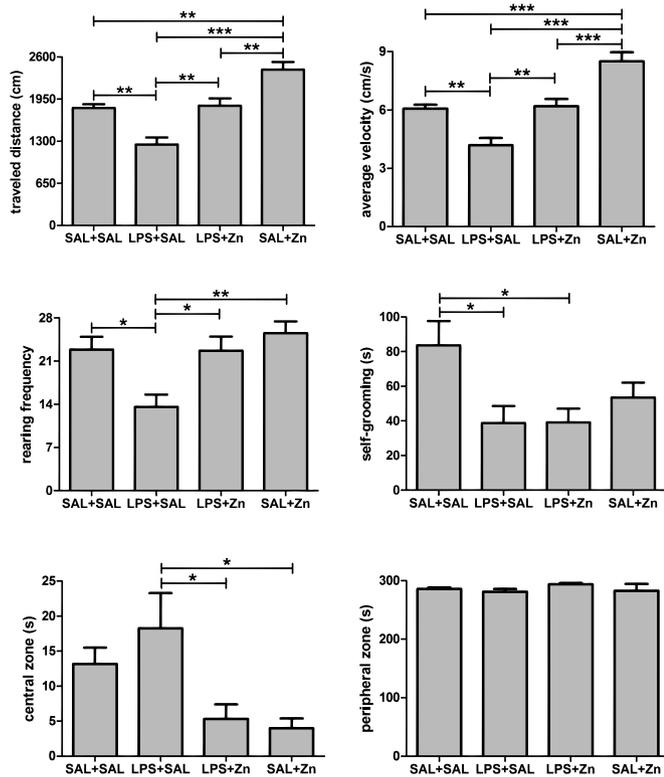
g, i.p.) e uma hora depois outra dose de salina s.c. na nuca. (2) LPS+SAL, LPS (0127:B8, 100  $\mu$ g/kg, i.p.) e uma hora depois salina (0,2 ml/100 g, s.c.). (3) LPS+Zn, LPS (100  $\mu$ g/kg, i.p.) e uma hora depois sulfato de zinco ( $ZnSO_4$ , 2 mg/kg, s.c.). (4) SAL+Zn, salina (0,2 ml/100 g, i.p.) e uma hora depois zinco (2 mg/kg, s.c.). Após uma hora da segunda injeção, cada rato foi colocado em tubo de contenção para uma sessão de duas horas. Nos cinco minutos finais da contenção, cada rato foi observado para vocalizações ultrassônicas em frequência de 22-kHz (Ultravox, Noldus). Parâmetros avaliados por cinco minutos: número de vocalizações, e tempo total, máximo, médio e mínimo de vocalizações e de silêncio (em secs). Após o teste de vocalização os ratos foram inseridos em arena de campo aberto. Parâmetros avaliados por cinco minutos (Ethovision, Noldus): distância percorrida (cm), velocidade média (cm/s), frequência de levantar, auto-limpeza (secs), e tempo (secs) nas zonas central e periféricas. Após o teste, o plasma foi obtido e utilizado para avaliar níveis de TNF- $\alpha$ , corticosterona, e fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), usando-se kits de ELISA. Os dados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Tukey. Os resultados são expressos em média  $\pm$  EP. Os resultados foram considerados significantes para  $p < 0,05$ . **Resultados:** Após o desafio estressor, o número de vocalizações de 22-kHz (Figura 1) dos ratos foi diminuído pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu a redução nas vocalizações, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) aumentou o número de vocalizações comparado aos valores dos três grupos. Os outros parâmetros de vocalizações ultrassônicas foram estatisticamente os mesmos entre os três grupos (dados não apresentados).



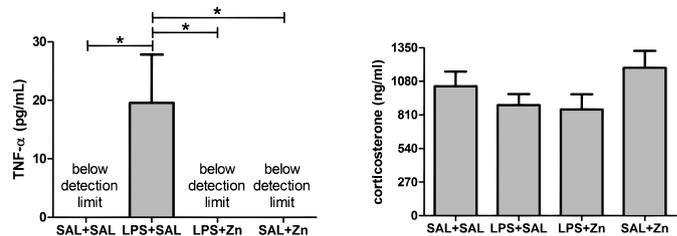
**Figura 1** - Efeitos do LPS (100  $\mu$ g/kg) e do zinco ( $ZnSO_4$ ; 2 mg/kg) no número de vocalizações de 22-kHz em ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois  $ZnSO_4$ ; e SAL+Zn, salina e uma hora depois  $ZnSO_4$  (n = 10 por grupo). \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0001$  (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média  $\pm$  EP

Após o desafio estressor, à distância percorrida e a velocidade média (Figura 2) dos ratos foram diminuídas pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu essa redução, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) aumentou a distância percorrida e a velocidade média comparadas aos valores dos três grupos. A frequência de levantar (Figura 2) dos ratos foi diminuída pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu essa redução, retornando aos valores do grupo controle. O zinco sem o LPS (SAL+Zn) não alterou o levantar comparando com os grupos SAL+SAL e LPS+Zn. A auto-limpeza (Figura 2) dos ratos foi diminuída pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). O tratamento com

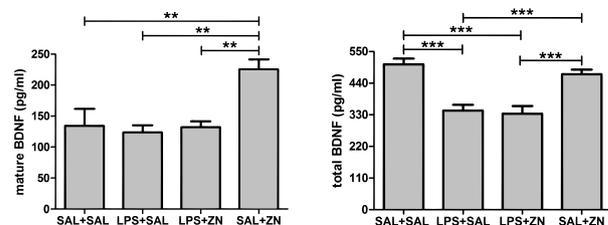
zinco com ou sem LPS (LPS+Zn e SAL+Zn) não impediu a redução da limpeza, resultando em resultados similares aqueles do grupo LPS+SAL. O tempo na zona central (Figura 2) dos ratos foi diminuído pelo zinco (LPS+Zn e SAL+Zn), comparado ao grupo LPS+SAL, mas não sem alterações para LPS+Zn e SAL+Zn versus SAL+SAL. Não foram verificadas diferenças para o tempo na zona periférica entre todos os grupos (Figura 2). Após o desafio estressor, os níveis de TNF- $\alpha$  (Figura 3) dos ratos foram aumentados pelo LPS (grupo LPS+SAL), comparado ao grupo controle (SAL+SAL). Como esperado, não foram detectados níveis de TNF- $\alpha$  nos animais não tratados com LPS (SAL+SAL e SAL+Zn). Interessantemente, o tratamento com zinco após LPS (LPS+Zn) preveniu a liberação de TNF- $\alpha$  no plasma, retornando aos mesmos valores que o grupo controle. Não foram verificadas diferenças para os níveis de corticosterona entre todos os grupos (Figura 3). Portanto, o eixo hipotálamo-pituitária- adrenal (HPA) parece não ter sido afetado pelos tratamentos. Após o desafio estressor, os níveis de BDNF maduro (Figura 4) dos ratos foram aumentados somente pelo zinco (grupo SAL+Zn), comparado aos dados dos outros três grupos. Os níveis de BDNF total (Figura 4) dos ratos foram diminuídos pelo LPS (grupos LPS+SAL e LPS+Zn), comparado aos dados do grupo controle; o zinco sem o LPS (SAL+Zn) resultou em valores semelhantes aqueles do grupo controle.



**Figura 2** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) na atividade geral em campo aberto em ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP



**Figura 3** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e corticosterona de ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP



**Figura 4** - Efeitos do LPS (100 µg/kg) e do zinco (ZnSO<sub>4</sub>; 2 mg/kg) nos níveis plasmáticos de BDNF maduro e total de ratos adultos após desafio estressor por contenção. SAL+SAL, salina e uma hora depois outra dose de salina; LPS+SAL, LPS e uma hora depois salina; LPS+Zn, LPS e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>; e SAL+Zn, salina e uma hora depois ZnSO<sub>4</sub>. (n = 10 por grupo). \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,0001 (ANOVA de uma via e teste de Tukey). Dados em média ± EP

**Conclusões:** A administração de LPS induziu o CD em ratos mesmo após desafio estressor, verificado pela diminuição da atividade geral, da comunicação e do aumento nos níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$ . O CD é considerado uma estratégia comportamental benéfica para melhor lidar com processos inflamatórios/infecciosos. Porém, em situações perigosas e estressantes o CD deve ser momentaneamente interrompido, para priorizar comportamentos ligados à sobrevivência, como a luta ou fuga. O tratamento com zinco foi capaz de prevenir o CD nos animais expostos ao LPS após o desafio estressor. Portanto, o tratamento com zinco foi benéfico para o animal doente melhorar sua resposta em situações de risco. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP no. 2012/07007-8 e temático no. 2009/51886-3), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Prêmio), e Universidade Paulista (UNIP no. 7-02-908/2014).

## Referências

- Larson SJ, Dunn AJ (2001) Behavioral effects of cytokines. *Brain Behav Immun* 15: 371-387.
- Hart BL (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12: 123-137.
- Yirmiya R, Weidenfeld J, Barak O, Avitsur R, Pollak Y, et al. (1999) The role of brain cytokines in mediating the behavioral and neuroendocrine effects of intracerebral mycoplasma fermentans. *Brain Res* 829: 28-38.
- Kent S, Bluthe RM, Kelley KW, Dantzer R (1992) Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol Sci* 13: 24-28.
- Dantzer R, Kelley KW (2007) Twenty years of research on cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun* 21: 153-160.
- Aubert A (1999) Sickness and behaviour in animals: a motivational perspective. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 23: 1029-1036.
- Aubert A, Goodall G, Dantzer R, Gheusi G (1997) Differential effects of lipopolysaccharide on pup retrieving and nest building in lactating mice. *Brain Behav Immun* 11: 107-118.
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.
- Miyake K (2003) Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol* 3: 119-128.

Kirsten TB, Lippi LL, Bevilacqua E, Bernardi MM (2013) LPS exposure increases maternal corticosterone levels, causes placental injury and increases IL-1 $\beta$  levels in adult rat offspring: relevance to autism. *PLoS One* 8: e82244.

Bluth RM, Walter V, Parnet P, Laye S, Lestage J, et al. (1994) Lipopolysaccharide induces sickness behaviour in rats by a vagal mediated mechanism. *C R Acad Sci III* 317: 499-503.

Maywald M, Rink L (2014) Zinc homeostasis and immunosenescence. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* [in press].

Tuerk MJ, Fazel N (2009) Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol* 25: 136-143.

Haase H, Overbeck S, Rink L (2008) Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: current status and future perspectives. *Experimental Gerontology* 43: 394-408.

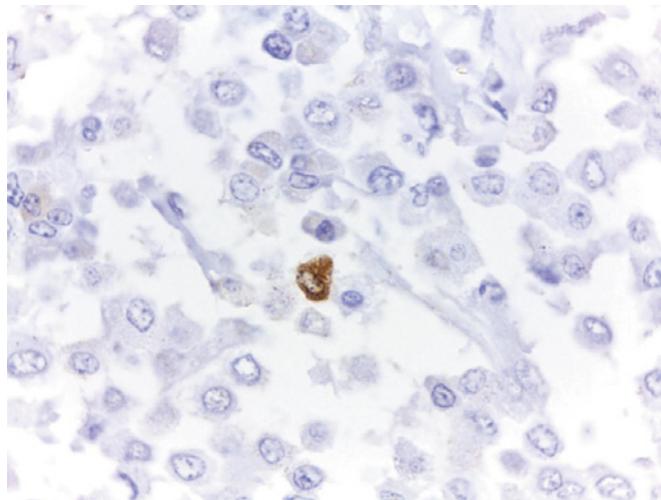
## EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS DE DIFERENTES GRAUS HISTOPATOLÓGICOS

MACEDO, B.M.<sup>1</sup>; BARRA, C.N.<sup>1,2</sup>; PULZ, L.H.<sup>1</sup>; KLEEB, S.R.<sup>3</sup>; XAVIER, J.G.<sup>3</sup>; NISHIYA, A.T.<sup>4</sup>; CATÃO-DIAS, J.L.<sup>2</sup>; FUKUMASU, H.<sup>1</sup>; STREFEZZI, R.F.<sup>1</sup>.

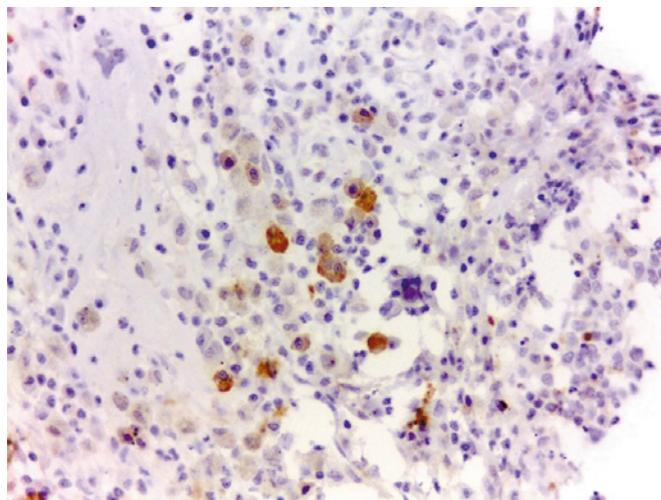
<sup>1</sup> Laboratório de Oncologia Comparada e Translacional (LOCT), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo. Pirassununga, SP, Brasil. <sup>2</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. <sup>3</sup> Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, SP, Brasil. <sup>4</sup> Universidade Anhembi-Morumbi, São Paulo, SP, Brasil.

**Introdução:** O mastocitoma, uma das neoplasias malignas de pele mais comuns dos cães, é normalmente classificado em três graus histológicos [1]. Recentemente, um novo método de classificação foi proposto, subdividindo estes tumores em apenas duas classes [2], com intuito de minimizar variações entre observadores, principalmente em relação aos tumores de grau II, e de tornar mais precisa a avaliação prognóstica para esta neoplasia. Semelhantemente, diversos outros métodos histomorfológicos e imuno-histoquímicos têm sido propostos no intuito de prever o comportamento desta neoplasia e melhorar os tratamentos disponíveis [3]. Sabe-se que para o desenvolvimento tumoral há necessidade de interação entre células e outros elementos teciduais, além de atividade proliferativa considerável e evasão da morte celular. A apoptose ocorre naturalmente em quase todos os tipos de células. A principal forma de ativação deste processo se dá pela via intrínseca, gerando o estímulo de morte por meio da formação de um complexo denominado apoptossomo. Este cliva caspases executoras, entre elas a caspase 3, desencadeando os eventos como a degradação e fragmentação nucleossomal. Alterações na expressão de caspase 3 podem ser consideradas como importantes para a progressão de tumores e para a resistência aos tratamentos [4]. Devido à sua importância na execução do processo de apoptose, a sua quantificação pode ser um importante marcador prognóstico para mastocitomas cutâneos caninos. O objetivo desta pesquisa foi a caracterização da expressão imuno-histoquímica da caspase 3 em mastocitomas cutâneos caninos, e a verificação das possíveis relações com graduação histopatológica. **Materiais e Métodos:** Quarenta e oito amostras de mastocitomas cutâneos caninos provenientes do Hospital Veterinário da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA-USP), bem como de Hospitais e Clínicas Veterinárias colaboradoras foram processados rotineiramente para histopatologia. Cortes histológicos foram corados com Hematoxilina e Eosina [5] para diagnóstico e graduação quanto à diferenciação celular, segundo os dois métodos de classificação mais utilizados [1,2]. Para as reações imuno-histoquímicas foi efetuada a incubação com o anticorpo primário anti-caspase 3 (policlonal de coelho anti-caspase 3 humana, Abcam, cód. ab4051), na diluição de 1:1500. As lâminas de controle negativo foram incubadas com IgG em substituição ao anticorpo primário e processadas simultaneamente para confirmar a especificidade dos anticorpos.

A imunomarcação para caspase 3 foi classificada, por 3 observadores simultâneos, em cinco campos de intensa marcação (“hot spots”) como: negativa, para os tumores sem expressão da proteína; 1+, para lesões com até 1% de células neoplásicas marcadas; ou 2+, para expressão em mais de 1% das células tumorais, conforme realizado por outros [4]. Os resultados foram comparados aos três graus histopatológicos, por meio de ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido de pós-testes de Dunn, ou pelo teste Mann-Whitney, com nível de significância estabelecido em 5%. **Resultados:** Foi observada marcação citoplasmática, finamente granular, em células isoladas (Figura 1) ou em pequenos grupos celulares (Figura 2). A distribuição dos casos analisados em função dos escores de marcação para caspase 3 e classificação histopatológica estão descritos na Tabela 1.



**Figura 1** - Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo canino apresentando célula isolada positiva para caspase 3. Obj. 100x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris



**Figura 2** - Fotomicrografia de mastocitoma cutâneo canino apresentando grupo de células positivas para caspase 3. Obj. 40x. Contracoloração com Hematoxilina de Harris

**Tabela 1** - Distribuição dos casos analisados em função dos escores de marcação para caspase 3 e classificação histopatológica utilizada

Escore para caspase 3*	Patnaik et al. [1]				
	Grau I (n=8)	Grau II (n=28)	Grau III (n=12)	Baixo grau (n=28)	Alto grau (n=20)
0	4 (50,0%)	10 (35,7%)	8 (66,7%)	12 (42,9%)	10 (50,0%)
1+	1 (12,5%)	11 (39,3%)	4 (33,3%)	7 (25,0%)	9 (45,0%)
2+	3 (37,5%)	7 (25,0%)	0 (0,00%)	9 (32,1%)	1 (5,0%)

\* 0 = negativo; 1+ = até 1% de células marcadas; 2+ = mais de 1% de células marcadas

Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes para

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.<sup>1</sup>; GOTARDO, A. T.<sup>2</sup>; GORNIK, S. L.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> FHOIUniararas - Fundação Hermínio Ometto. Av. Dr. Maximiliano Baruto, 500 13607-339 Araras – SP, Brasil. Email: talita\_brasileiro@hotmail.com

<sup>2</sup> 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.; GORNIK, 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.<sup>1</sup>; BARRA, C.N.<sup>1,2</sup>; PULZ, L.H.<sup>1</sup>; KLEEB, S.R.<sup>3</sup>; XAVIER, J.G.<sup>3</sup>; NISHIYA, A.T.<sup>4</sup>; CATÃO-DIAS, J.L.<sup>2</sup>; FUKUMASU, H.<sup>1</sup>; STREFEZZI, R.F.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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.

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

<sup>4</sup> 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).

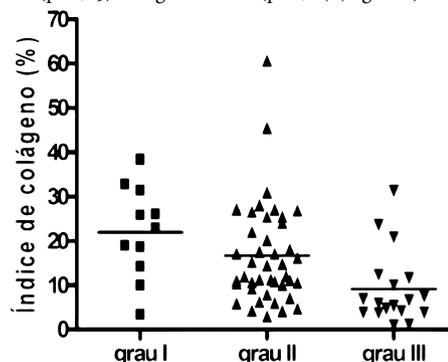
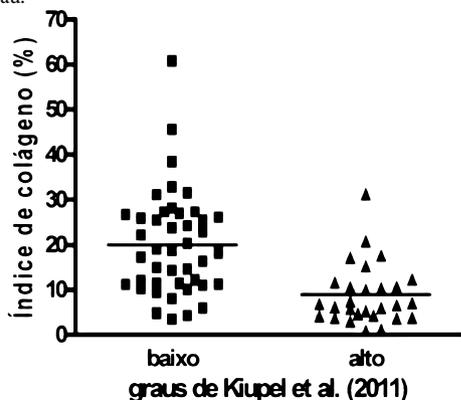


Figura 1 - Distribuição dos valores de índice de colágeno nas amostras de diferentes graus histopatológicos com base na classificação de Patnaik et al. (1984) e suas respectivas médias. ANOVA/Kruskal-Wallis,  $p=0,0012$ , com  $p<0,05$  entre os graus II e III, e  $p<0,01$  entre os graus I e III

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, 2014<sup>11</sup> 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.

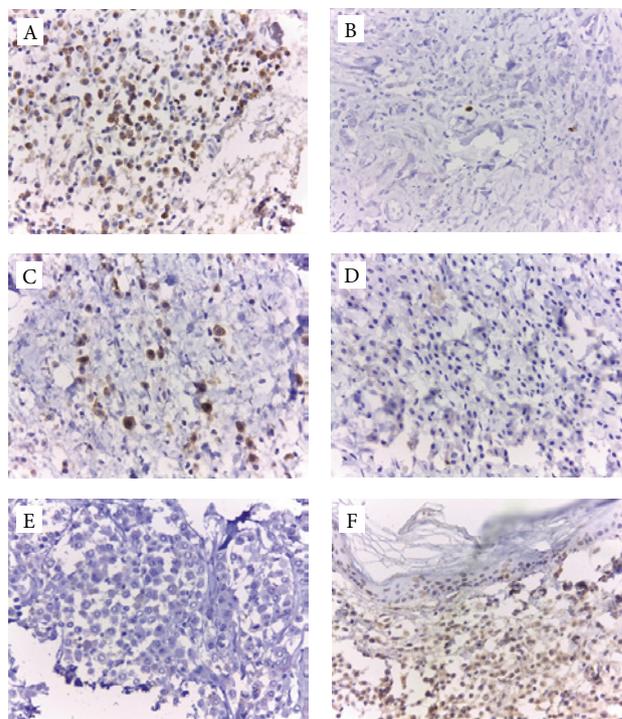
## Referências Bibliográficas

- 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.; JANOVIĆ, 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.<sup>1</sup>; PULZ, L.H.<sup>2</sup>; BARRA, C.N.<sup>2</sup>; STREFEZZI, R.F.<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo - Pirassununga/SP
- <sup>2</sup> 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 humanos<sup>4</sup>. 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 efetinado 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, 1984<sup>9</sup> 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 2011<sup>7</sup>, 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 imunomarcação 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<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> 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., Stefcick 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

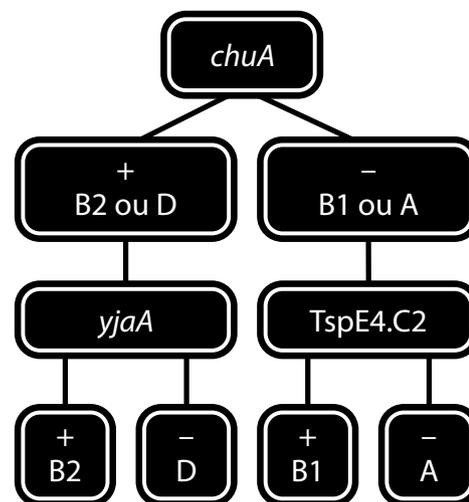
### ANÁLISE FILOGENÉTICA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGENICA (EPEC) E PRODUTORAS DE TOXINA SHIGA (STEC) ISOLADAS DE FEZES DE PSITACÍDEOS: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ZOOINÓTICO

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

<sup>1</sup>Faculdade 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 produzem 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 TSP E4.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

de colibacilose. Os genes de virulência detectados sugerem que amostras de *E. coli* isoladas de animais doentes apresentaram alguns fatores de virulência do patótipo de *E. coli* patogênica para aves (APEC). Em contraste, no presente trabalho, das amostras isoladas de *Escherichia coli* das fezes de papagaios clinicamente saudáveis, 14,58% foram classificadas como EPEC típicas (7/48) e 10,42% como EPEC atípicas (5/48). Reservatórios animais têm papel relevante na epidemiologia das infecções causadas por STEC [10]. As STEC podem ser encontradas no trato gastrointestinal de uma variedade de animais como suínos, ovinos, cavalos, aves, cães e gatos; sendo os bovinos considerados como o principal reservatório deste patótipo [11]. Estirpes de *Escherichia coli* produtoras de toxina Shiga também já foram isoladas de dejetos de aves, como pombos e gaivotas [12,13]. No presente também foi encontrada alta frequência (54,5% - 6/11) de STEC em periquitos australianos. Todas as STEC analisadas foram alocadas no grupo B2. Seis das EPEC típicas pertencem ao grupo B2, uma ao grupo A e uma ao grupo D. Considerando-se as EPEC atípicas, uma delas foi classificada no grupo B2 e a outra no grupo filogenético A. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Espécie, patótipo e respectivos grupos filogenéticos obtidos através da análise dos genes *chuA*, *yjA* e do fragmento *TspE*, São Paulo, 2014

Espécie	Patótipo	Tamanho da amostra (n)	<i>chuA</i>	<i>yjA</i>	<i>TspE</i>	Grupo filogenético
<i>Nymphicus hollandicus</i>	EPEC-t	11	+	+	*	B2
<i>Melospittacus undulatus</i>	STEC	6	+	+	*	B2
<i>Amazonas spp.</i>	EPEC-t	6	+	+	*	B2
		1	+	-	*	D
		1	-	*	-	A
<i>Ara ararauna / Guaruba guarouba</i>	EPEC-a	1	+	+	*	B2
		1	-	*	-	A

\* gene/fragmento não pesquisado, devido à classificação prévia da amostra segundo a árvore de decisão dicotômica

Filogeneticamente as linhagens patogênicas de *E. coli* agentes de doenças extraintestinais têm sido classificadas como pertencentes ao grupo D e, em sua maioria, ao grupo B2, enquanto as comensais e isolados de diarreia são normalmente encontradas como membros dos grupos A, B1 e D [14]. As STEC costumam ser enquadradas principalmente no grupo B1 e A, mas também podem ser encontradas, em menor proporção, nos outros dois grupos [15, 16]. Neste contexto, com exceção de algumas *E. coli* aderentes difusas e EPEC do grupo 1, estirpes causadoras de diarreias não são do grupo B2. Relata-se que estirpes do grupo B2 podem ser as mais frequentemente isoladas em fezes de humanos assintomáticos [17]. Portanto, o caráter antropozoonótico de infecção entre psitacídeos de cativeiros e humanos torna-se uma hipótese evidente. Rodriguez-Siek et al. (2005) [18], identificaram metade dos casos de colibacilose aviária pertencentes aos grupos filogenéticos A e B1 e, a outra metade, inclusas nos grupos B2 e D. Esses autores levantaram a hipótese que a classificação de metade das amostras em um grupo considerado não patogênico poderia ser explicada pela característica oportunista das infecções por *E. coli*. Saldenberg (2012) [19] descreveu amostras de psitacídeos sintomáticos positivas para o grupo A e, minoritariamente, para o grupo D, creditando também o resultado obtido ao caráter oportunista da infecção, já que grande parte destas amostras seria classificada em grupos mais patogênicos do que o grupo filogenético A. Estas teorias também se aplicam nos resultados obtidos do presente trabalho, já que, EPEC típicas (89,47% - 17/19), EPEC atípicas (50% - 1/2) e STEC (100% - 6/6) foram alocadas no grupo B2, não sendo o trivial. O genoma da *Escherichia coli* parece ser composto por uma origem “ancestral” conservada, que contém a informação genética necessária as funções celulares primordiais; e outra “derivada”, flexível, que permite a expressão dos fatores de virulência [20]. Mutações pontuais, rearranjos genéticos e transferência horizontal de genes são alguns dos mecanismos responsáveis pela grande diversidade de bactérias [21]. Enquanto as mutações pontuais e rearranjos

genéticos levam a um desenvolvimento evolutivo lento, sem a criação de novos determinantes genéticos, a transferência horizontal de genes cria genomas extremamente dinâmicos, capazes de, em um único passo, transformar um organismo normalmente benigno num agente potencialmente patogênico [22]. Muitos fatores relacionados ao comportamento destas estirpes humanas em hospedeiros animais, incluindo as aves, ainda não foram elucidados.

**Conclusões:** Neste projeto, a detecção de EPECs e STECs em diferentes espécies de psitacídeos mantidos em cativeiro aponta um risco zoonótico potencial. A maioria das amostras foi classificada como pertencente ao grupo filogenético B2, que abriga estirpes com maior potencial de virulência. Considerando a *Escherichia coli* como uma espécie bacteriana extremamente versátil e de alta plasticidade genômica é possível que o encontro destes patótipos e grupos filogenéticos em aves, esteja relacionado à transferência antropozoonótica dos fatores de virulência. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Projeto 2013/ 24052-0).

## Referências

- Fairbrother, J.M., Nadeau, E. 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Revue scientifique et technique*, v.25, n.2, p.555-569.
- Chomel, B. B., Belotto, A., Meslin, F. X. 2007. Wildlife, Exotic Pets, and Emerging Zoonoses. *Emerging Infectious Disease*, v.13, p.1.
- Barnes, H.J., Vaillancourt, J.P., Gross, W.B. 2004. Colibacillosis. In: Saif, Y. M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, Swayne, L. R. D. E. *Diseases of Poultry*, p. 631-656.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 10, p. 4555-4558.
- Ferreira, A. J. P.; Knöbl, T. 2000. Colibacilose aviária. In: Berchieri, J.R.A., Macari, M. *Doença das aves*. Campinas: Facta, p. 30-41.
- Trabuñi, L. R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n.5, p. 508-513.
- Boom, R., Sol, C.J.A., Salimans, M.M.M., Jansen, C.L., Werthein-van Dillen, P.M.E., Van der Noorda, J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, p.495-503.
- Costa, A. R. F., Lima, K. V. B., Sousa, C. O., Loureiro, E. C. B. 2010. Desenvolvimento de PCR multiplex para detecção e diferenciação de categorias de *Escherichia coli* diarréogênicas. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v.1, n.2, p. 77-84.
- Knöbl, T., Godoy, S. N., Matushima, E. R., Guimarães, M. B., Ferreira, A.J.P. 2008. Caracterização molecular dos fatores de virulência de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de papagaios com colibacilose aviária. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v.45, p. 54-60.
- Castro, A.F.P., Bentancor, A., Mercado, E.C., et al. 2010. *Escherichia coli* Animal Reservoirs, Transmission Route and Animal Disease. In: *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. p.223-248.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., Oswald, E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*; 36(3): 289-311.
- Schmidt, H., Scheef, J., Morabito, S., Caprioli, A., Wieler, L.H., Karch, H. 2000. A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. *Applied and Environmental Microbiology*; 66(3): 1205-08.
- Makino, S., Kobori, H., Asakura, H., Watarai, M., Shirahata, T., Ikeda, T., Takeshi, K., Tsukamoto, T. 2000. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiology & Infection*.125: 55-61.
- Girardeau, J.P., Dalmasso, A., Bertin, Y., Ducrot, C., Bord, S., Livrelli, V., Vernozy- Rozand, C., Martin, C., 2005. Association of virulence genotype with phylogenetic background in comparison to different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 6098-6107.
- Son, I., Kessel, J.A.S.V., Karns, J.S. 2009. Genotypic diversity of *Escherichia coli* in a dairy farm. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6(7): 837-847.
- Koo, H.J., Kwak, H.S., Yoon, S.H., Woo, G.J. 2012. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 1813-16.
- Zhang, L., B. Foxman, and C. Marrs. 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology*. 40:3951-3955.

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J.; Nolan, L.K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, v. 36, n.2, p. 241-256.

Saidenberg, A.B.S., Guedes, N.M.R., Seixas, G.H.F., Allgayer, M.C., Assis, E.P., Silveira, L.F., Melville, P.A., Benites, N.R. 2012. A survey for *Escherichia coli* virulence factors in asymptomatic free-ranging parrots. *Journal of Veterinary Science*; 12(1)1-6.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J. 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2:414-424.

Arber, W. 1993. Evolution of prokaryotic genomes. *Gene* 135: 49-56.

Kaper, J.B., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Gomez-Duarte, O. 1997. Genetics of virulence of enteropathogenic *E. coli*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 412: 279-287.

## INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### EXPOSIÇÃO A POLUENTE OCUPACIONAL DURANTE A GESTAÇÃO CAUSA IMUNOSSUPRESSÃO DA INFECÇÃO PULMONAR NA PROLE

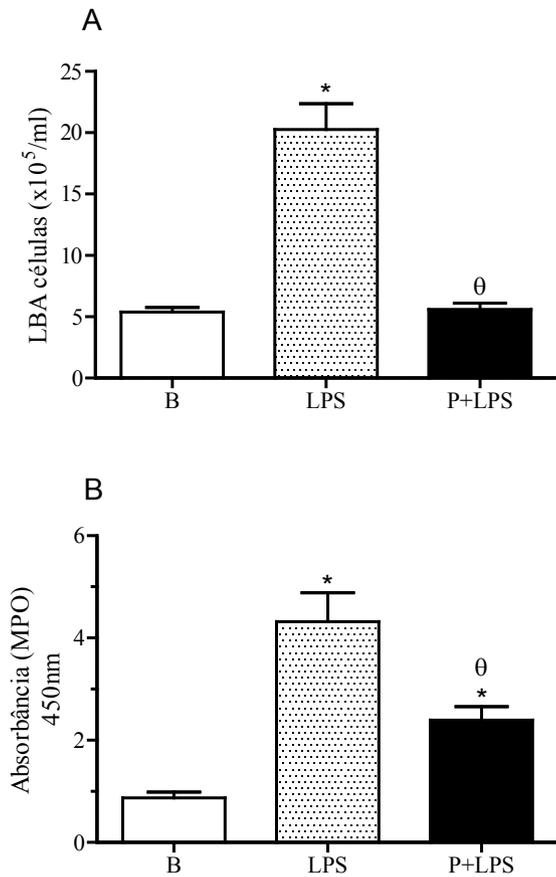
<sup>1</sup>IBRAHIM, B.S.; <sup>1</sup>DREWES, C.C.; <sup>2</sup>TAVARES-DE-LIMA, W.; <sup>1</sup>FARSKY, S.H.P.; <sup>3</sup>LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A.

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo; <sup>2</sup>Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo; <sup>3</sup>Universidade Nove de Julho, Departamento de Biofotônica Aplicada as Ciências da Saúde.

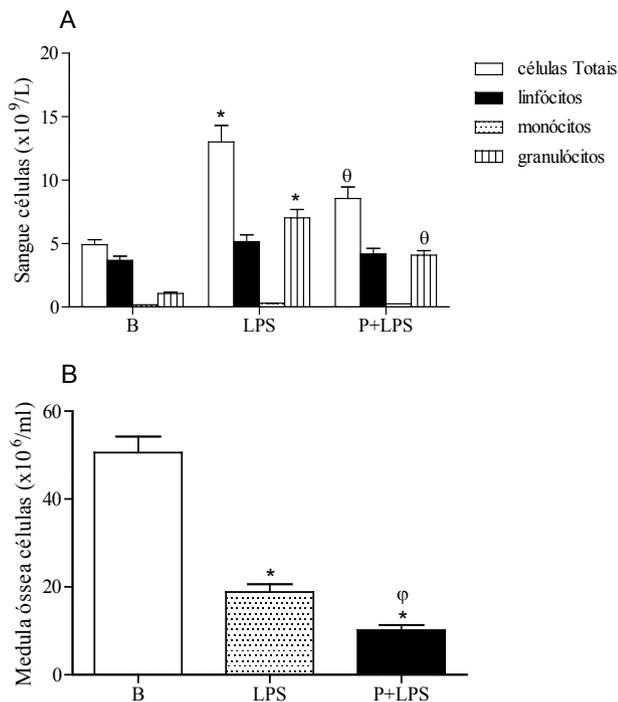
**Introdução e objetivos:** O Formaldeído (FA) é um poluente utilizado mundialmente desde a saúde até a produção de materiais [1, 2, 3]. O FA também está presente em alimentos e é expelido na fumaça do cigarro. Ainda, profissionais da saúde, bem como indivíduos que utilizam técnicas de estudos em patologia, histologia e anatomia, estão expostos às ações do FA em decorrência de suas atividades [4, 5]. A poluição ambiental e ocupacional é objeto de estudo de muitos pesquisadores devido as suas graves implicações em saúde pública. Estudos epidemiológicos mostram que a exposição a poluentes durante a gravidez acarreta em fator de risco para desencadeamento de doenças inflamatórias pulmonares, entretanto ainda desconhecem-se os mecanismos envolvidos [6].

Os mecanismos subjacentes à inflamação pulmonar aguda decorrente da inflamação sistêmica podem ser investigados experimentalmente pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) por via sistêmica [7]. O LPS pode ser classificado como um dos principais PAMPs (moléculas indutoras de inflamação), e é parte constituinte da parede de bactérias Gram-negativas. Seus efeitos são mediados por Toll-like receptor 4 (TLR4) [8, 9]. Após ativação do TLR4, é desencadeada uma cascata de sinalização, culminando na ativação do fator de transcrição NF-κB (nuclear factor κB), que promove a expressão de diversos genes inflamatórios [10]. Considerando que a exposição ao FA durante a gestação altera a resposta imune na prole [11], o presente trabalho foi delineado para investigar a repercussão desta exposição no desencadeamento de infecção pulmonar induzida por LPS. **Material e métodos:** Grupos de ratas prenhas foram expostas ao FA (0,75 ppm) ou ao seu veículo (água destilada) 1h/dia, cinco dias/semana, durante todo o período de gestação (21 dias). Após 30 dias do nascimento, a prole recebeu via intraperitoneal 5mg/kg de LPS (*Salmonella abortus equi*) para indução de infecção pulmonar. Após 24h da administração foram realizadas as análises: contagem de células presentes no lavado broncoalveolar (LBA), quantificação de leucócitos circulantes no sangue periférico e na medula óssea, determinação da atividade de mieloperoxidase pulmonar (MPO), determinação da reatividade traqueal

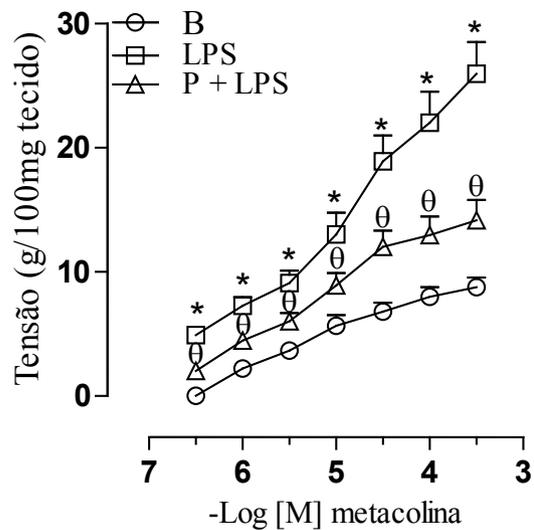
ex-vivo à metacolina (MCh) e avaliação da translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo. A investigação do estresse oxidativo gerado durante a exposição ao FA, sobretudo no ambiente uterino, foi efetuada em grupos de ratas prenhas tratadas com vitamina C (150mg/Kg, via oral) 30 minutos antes de cada exposição ao FA. Os grupos controle consistiram de ratas tratadas com veículo (água destilada). Os grupos delineados no estudo foram: B (proles não manipuladas originadas de mães não manipuladas), LPS (proles submetidas à administração de LPS originadas de mães expostas ao veículo do poluente) e P+LPS (proles submetidas à administração de LPS originadas de mães expostas ao FA 0,75 ppm). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida de pós-teste Student Newman-Keuls para comparação de todos pares de colunas. Os resultados foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos. **Resultados:** O painel A da figura 1 representa a contagem de células totais recuperadas no LBA. Observa-se que o grupo LPS apresentou aumento significativo no número de células recrutadas para o pulmão quando comparado ao grupo B. Por outro lado, o grupo P+LPS mostrou reduzido número de células totais em relação ao grupo LPS e não diferiu do grupo B. Similarmente ao observado no painel A, a figura 1 (painel B) mostra aumento significativo na atividade de MPO pulmonar no grupo LPS em relação ao grupo B. No entanto, nota-se uma redução da atividade de MPO no grupo P+LPS em relação ao grupo LPS, enquanto há um aumento em relação ao grupo B. A figura 2 (painel A) representa as contagens de células totais e diferenciais presentes no sangue periférico. Nota-se que o grupo LPS mostrou aumento significativo tanto no número de células totais como de granulócitos em relação ao número obtido no grupo B e não apresentou diferenças no número de linfócitos e monócitos. Por outro lado, o grupo P+LPS mostrou redução no número de células totais e granulócitos em relação ao grupo LPS e não diferiu do grupo B. O painel B da figura 2 representa a contagem total de células presentes na medula óssea. Verificou-se uma diminuição do número de células no grupo P+LPS em relação aos grupos LPS e B. Ainda, o grupo LPS mostrou redução no número de células da medula quando comparado ao grupo B. A figura 3 representa a contratilidade da traqueia frente à administração de diferentes concentrações de metacolina. Observa-se que os grupos LPS e P+LPS apresentaram aumento da contratilidade traqueal frente à metacolina em comparação ao grupo B. Por outro lado, a reatividade traqueal no grupo P+LPS foi reduzida significativamente quando comparada a do grupo LPS. A figura 4 representa a quantificação do NF-κB presente na fração nuclear de células obtidas a partir de extratos de pulmões dos grupos estudados. Nota-se que o grupo LPS apresentou aumento da translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo em relação ao grupo B. Entretanto, tal translocação apresentou-se reduzida no grupo P+LPS em relação aos grupos LPS e B. A figura 5 mostra que o tratamento com vitamina C antes da exposição das ratas prenhas ao FA (grupo Vit C+P+LPS) induziu a resposta desencadeada pelo LPS como mostrado pelo aumento no número de células totais em relação ao grupo P+LPS. Nota-se que este aumento também se sobrepôs ao obtido pelo grupo LPS.



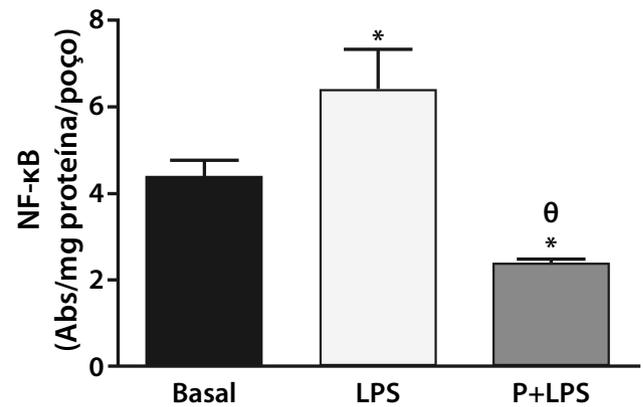
**Figura 1** - Avaliação da exposição ao FA durante a gestação e sua repercussão na inflamação pulmonar na prole após indução com LPS



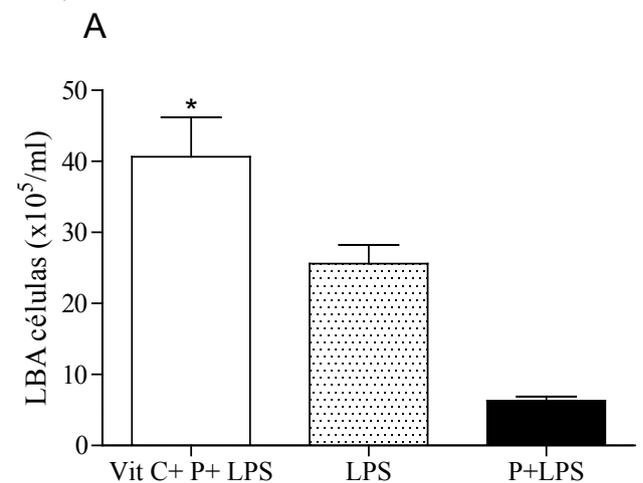
**Figura 2** - Avaliação da exposição ao FA durante a gestação e sua repercussão nos compartimentos sanguíneos e de medula óssea na prole após indução de infecção com LPS



**Figura 3** - Avaliação da exposição ao FA durante a gestação e sua repercussão na reatividade traqueal da prole após indução de infecção com LPS



**Figura 4** - Avaliação da exposição ao FA durante a gestação e sua repercussão na translocação do NF-κB do citoplasma para o núcleo em células obtidas a partir de extratos pulmonares da prole após indução de infecção com LPS



**Figura 5** - Avaliação do tratamento com vitamina C nos efeitos da exposição ao FA durante a gestação e sua repercussão na indução de inflamação pulmonar na prole após indução de infecção com LPS

**Conclusão:** Os resultados obtidos demonstraram que a exposição ao FA durante a gestação alterou a resposta imune da prole mediante a indução de infecção por LPS. Tal efeito parece ser mediado pelo estresse oxidativo no ambiente uterino, uma vez que o tratamento com vitamina C reverteu a imunossupressão. Ainda, houve diminuição da translocação do fator de

transcrição NF- $\kappa$ B do citoplasma para o núcleo, fato que pode se relacionar tanto à menor resposta celular como à hiporreatividade traqueal. Estes dados mostram que exposição ao FA durante a gestação acarreta uma deficiência nos mecanismos de defesa da prole, devido a alterações estabelecidas no mecanismo de programação fetal. **Agradecimentos:** O presente estudo recebeu financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo: Beatriz Silva Ibrahim é bolsista de iniciação científica (2013/19708-3) e Adriana Lino dos Santos Franco recebeu auxílio Jovens Pesquisadores em Centros Emergentes (2011/51711-9).

## Referências

- CARLSON, R.M., SMITH, M.C. NEDOROST, S.T. Diagnosis and treatment of dermatitis due to formaldehyde resins in clothing. *Dermatitis*, 15, 169-175, 2004.
- FLÓ-NEYRET, C.; LORENZI FILHO, G.; MACCHIONE, M.; GARCIA M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Effects of formaldehyde on the frog's mucociliary epithelium as a surrogate to evaluate air pollution effects on the respiratory epithelium. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 34, p. 639-643, 2001.
- OSHA, 2001 (Occupational Safety & Health Administration).
- MIZUKI, M., TSUDA, T. Relationship between atopic factors and physical symptoms induced by gaseous formaldehyde exposure during an anatomy dissection course. *Arerugi*, 50, 21-28, 2001.
- WANTKE, F.; FOCKE, M.; HEMMER, W.; BRACUN, R.; WOLF-ABDOLVAHAB, S.; GÖTZ, M.; JARISCH, R. Exposure to formaldehyde and phenol during an anatomy dissecting course: sensitizing potency of formaldehyde in medical students. *Allergy*, v.55, p.84-87, 2000.
- RAHERISON C, PÉNARD-MORAND C, MOREAU D, CAILLAUD D, CHARPIN D, KOPFERSMITT C, LAVAUD F, TAYTARD A, ANNESI-MAESANO I. In utero and childhood exposure to parental tobacco smoke, and allergies in schoolchildren. *Respir Med.*, 101(1):107-17, 2007.
- BRIGHAM, K. L. and MEYRICK, B. Endotoxin and lung injury. *The American Review of Respiratory Disease*, v. 133, p. 913-27, 1986.
- CAROFF, M. and KARIBIAN, D. Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 338, p. 2431-4, 2003.
- POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; HE, X.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; MCNALLY, O.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; DU, X.; THOMPSON, P.; CHAN, E. K.; LEDESMA, J.; ROE, B.; CLIFTON, S.; VOGEL, S. N.; BEUTLER, B. Genetic and physical mapping of the LPS locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, v. 24, p. 340-55, 1998
- DENG, L.; WANG, C.; SPENCER, E.; YANG, L.; BRAUN, A.; YOU, J.; SLAUGHTER, C.; PICKART, C.; CHEN, Z. J. Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, v. 103, p. 351-61, 2000.
- MAIELLARO, M.; CORREA-COSTA, M.; VITORETTI, L.B.; GIMENES-JUNIOR, J.A.; CÂMARA, N.O.S.; DE LIMA, W.T.; FARSKY, S.H.P.; LINO-DOS-SANTOS-FRANCO, A. Exposure to low doses of formaldehyde during pregnancy suppresses the development of allergic lung inflammation in offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 278(3): 266-274, 2014.

## MESTRADO – MEDICINA VETERINÁRIA

### A TERAPIA FOTODINÂMICA E OS EFEITOS PROMOVIDOS EM ÓRGÃOS IMUNOLÓGICOS E IMPLANTE SECUNDÁRIO DO TUMOR DE EHRLICH APÓS TRATAMENTO DO TUMOR PRIMÁRIO EM FOCO DISTANTE

DEL-GRANDE, M.P.<sup>1</sup>; DAGLI, M.L.Z.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 - 05508-900 - São Paulo, SP, Brasil. e-mail: murilo.p.grande@gmail.com

**Introdução:** A terapia fotodinâmica (*Photodynamic Therapy - PDT*) é um método empregado para tratar neoplasias baseado na interação entre luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizador. Após a administração

do fotossensibilizante, o tumor é iluminado com luz visível de comprimento de onda específico (Laser), ativando o agente, e produzindo espécies reativas de oxigênio, altamente citotóxicas, que provocam morte celular por necrose e apoptose, e destruição do tecido tumoral [1]. A característica singular da PDT é a participação ativa do sistema imunológico no combate às células tumorais. Os efeitos fototóxicos na membrana celular liberam uma série de mediadores inflamatórios levando a ativação do sistema imune inato. A inflamação local e a invasão por neutrófilos, macrófagos e células *natural killer* junto à destruição das células neoplásicas determinam a condição necessária para a apresentação de antígenos tumorais às células dendríticas e demais células apresentadoras de antígenos. A apresentação antigênica promove ativação do sistema imune adaptativo e há a sensibilização dos linfócitos T efetores (CD8+), determinando uma resposta específica para a neoplasia tratada, envolvida na erradicação de focos disseminados e/ou metastáticos. Além disso, há a sensibilização de linfócitos B (de memória) aos antígenos tumorais, promovendo um controle em longo prazo do tumor. A produção de anticorpos antitumorais pelos plasmócitos pode ser sugerida, porém ainda não foi demonstrada em modelo experimental [2,3,4,5]. O presente trabalho foi delineado para avaliar o comportamento de um foco tumoral secundário após o tratamento com a PDT, ou a excisão cirúrgica, em um tumor primário e as possíveis alterações em órgão linfóides, utilizando-se para tanto o tumor de Ehrlich na sua forma sólida. **Material e Métodos:** Inicialmente trinta camundongos foram inoculados com solução contendo  $2,5 \times 10^6$  células tumorais no tecido subcutâneo da região do dorso (Tumor primário). Após dez dias os animais foram divididos em três grupos de tratamento: grupo PDT [Azul de Metileno 1% intratumoral e irradiação com laser vermelho (660nm) totalizando 54 joules de energia], grupo CIRURGIA (excisão cirúrgica do tumor) e grupo CONTROLE (sem tratamento do tumor). Os animais receberam então uma nova inoculação de células tumorais no coxim plantar do membro posterior esquerdo (Tumor secundário). Os animais foram avaliados durante 17 dias, comparando-se os grupos. Os parâmetros avaliados foram o crescimento tumoral, peso relativo e análise histopatológica dos órgãos linfóides (Baço e Linfonodo poplíteo), contagem de leucócitos sanguíneos e morfometria do tumor secundário (determinação da fração volumétrica dos componentes da massa tumoral: células tumorais, infiltrado inflamatório e necrose). A análise dos resultados obtidos foi efetuada com os programas estatísticos Minitab 16° e GraphPad Prism5.00°. Para os dados paramétricos foi utilizada a ANOVA seguida do teste de Turkey. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. A curva de crescimento do tumor de Ehrlich secundário foi analisada por ANOVA de duas vias. Foram consideradas estatisticamente significantes as análises com nível de significância  $p < 0,05$ . Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. **Resultados:** O Gráfico 1 ilustra a curva de crescimento do tumor secundário no coxim plantar esquerdo nos grupos tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais.

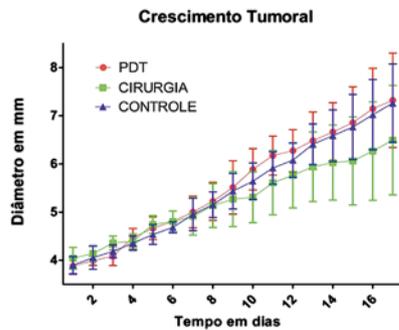


Gráfico 1 - Curva de crescimento do diâmetro (mm) do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle), pelo tempo (dias) nos diferentes grupos

A figura 1 ilustra os dados referentes à fração volumétrica (FV) dos componentes da massa tumoral. Os dados são expressos em porcentagem. Os componentes considerados foram células tumorais, infiltrado inflamatório, necrose e outras estruturas presentes (vasos, músculos, etc.). A FV de células tumorais é maior no grupo cirurgia e a FV de infiltrado inflamatório menor neste grupo. A FV de necrose não apresentou diferença entre os grupos.

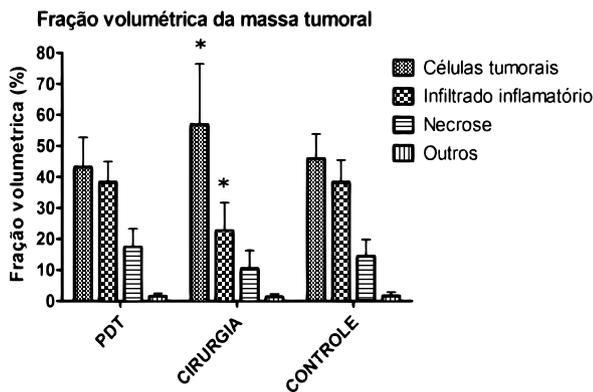


Figura 1 - Fração volumétrica de cada componente da massa tumoral do coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 2 ilustra os dados referentes à porcentagem da área em necrose na massa tumoral. O grupo cirurgia apresentou uma porcentagem de área em necrose menor que os grupos PDT e controle.

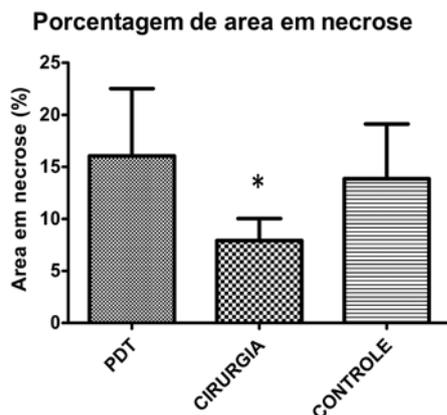


Figura 2 - Área em necrose (%) da massa tumoral no coxim plantar esquerdo de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 3 ilustra os dados referentes ao peso relativo do baço. O peso relativo do baço no grupo cirurgia foi menor quando comparado aos grupos PDT e controle.

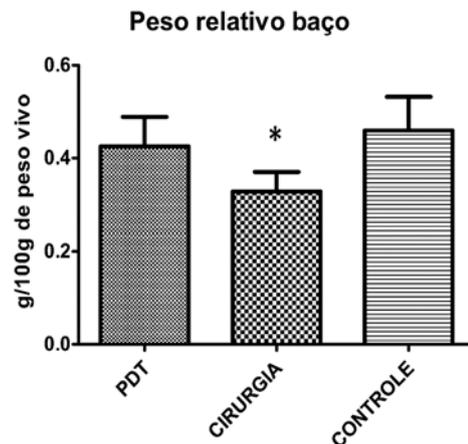


Figura 3 - Peso relativo do baço (g/100g de PV) de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle)

A figura 4 ilustra o padrão histológico encontrado no baço dos camundongos. Os animais do grupo cirurgia não apresentaram alterações morfológicas importantes nas estruturas do órgão (Figura 23 A). Nos animais que receberam o tratamento com a PDT (Figura 23 B) e nos animais que não receberam tratamento algum (Figura 23 C), foi observado que a arquitetura do órgão estava preservada, entretanto os folículos linfóides, os respectivos centros germinativos e a sua zona marginal apresentavam-se aparentemente mais proeminentes, com áreas de coalescência dos folículos. Observou-se a manutenção da arquitetura das regiões de polpa vermelha. Os achados sugerem uma discreta hiperplasia linfóide do baço nestes animais.

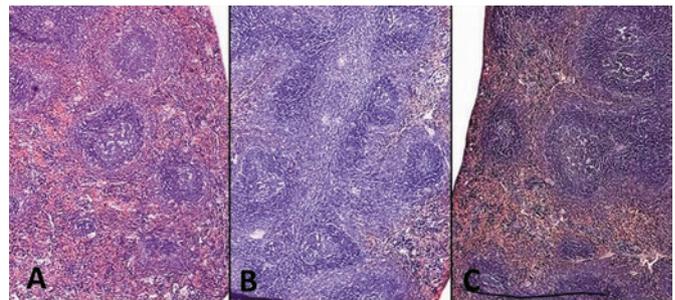


Figura 4 - Fotomicrografia de corte histológico do baço de camundongos portadores do tumor de Ehrlich e tratados com PDT, cirurgia ou sem tratamento (controle) (H&E objetiva 4x)

O peso relativo do linfonodo poplíteo esquerdo e sua análise histológica não apresentaram diferenças entre os grupos experimentais, assim como a contagem total de leucócitos circulantes. **Conclusão:** A terapia fotodinâmica foi capaz de produzir efeitos sobre o crescimento de um tumor de Ehrlich sólido secundário, inoculado em camundongos, previamente tratados em tumor primário à distância. Houve indução de necrose e inflamação aguda, assim como diferenças no padrão de resposta imunológica quando comparado aos animais tratados cirurgicamente.

#### Referências

- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2004.
- GOMER, C. J.; FERRARIO, A.; MURPHREE, A. L. The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis. **British Journal of Cancer**, v. 56, p. 27-32, 1987.
- KORBELIK M. Induction of Tumor Immunity by Photodynamic Therapy. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 14, n. 5, p. 329-334, 1996.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three – photosensitizers pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 91-106, 2005.

CASTANO A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 535-545, 2006.

## CÉLULAS-TRONCO DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CÃO COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA O TRATAMENTO DE CERATOCONJUNTIVITE SECA EM CÃES

RAMOS S.D.; CRUZ, R.M.A.; MIGLINO M.A.; BELTRÃO-BRAGA, P.C.B, PIGNATARI, G.C.

Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo

**Introdução:** A Ceratoconjuntivite Seca (KCS – *Keratoconjunctivitis Sicca*) é uma condição multifatorial que geralmente resulta de alterações quantitativas do componente aquoso do filme lacrimal, podendo ainda, decorrer de deficiência dos componentes lipídicos e mucoso, normalmente atribuída a uma desordem imunomediada. O diagnóstico da KCS é baseado nos sinais clínicos tais como: secreção mucopurulenta, hiperemia conjuntival, blefaroespasmos, fotofobia, incômodo, dor, vascularização, pigmentação e opacidade corneana. Para tanto, dois testes oftalmológicos simples podem ser realizados: o teste de Schirmer e o Butt. O tratamento convencional preconizado hoje são aplicações diárias de pomada ou, então de colírio oftálmicos à base de Ciclosporina 0,2% ou Tacrolimus 0,03%. Esses tratamentos são custosos, não curativos e exigem muito a colaboração do proprietário. Nos últimos anos a terapia celular com células-tronco trouxe uma nova esperança para o cenário da medicina veterinária quanto ao tratamento de doenças que ainda não possuem um tratamento efetivo. A obtenção de células-tronco de anexos embrionários, nos quais os tecidos são comumente descartados no momento do nascimento ou em campanhas de castração, está se tornando muito interessante. Já foi descrito que as células-tronco obtidas da membrana amniótica humana possuem propriedades regenerativas e imunomoduladoras observadas em células-tronco mesenquimais obtidas de outras fontes. O isolamento e a caracterização de células-tronco de membrana amniótica de cães em diferentes períodos gestacionais já foram obtidos com sucesso. Além da caracterização, estas células foram testadas quanto sua capacidade tumorigênica, quando da sua injeção de aproximadamente um milhão destas células-tronco pela via subcutânea na região cervical de camundongos imunossuprimidos e não foi constatada a formação tumoral, após 60 dias da injeção. O presente trabalho foi delineado para avaliar a eficiência do emprego de células-tronco da membrana amniótica para o tratamento da KCS em cães. Foram empregados os parâmetros clínicos rotineiros em oftalmologia para os sinais clínicos bem como, os testes oftálmicos, de Schirmer e Butt. Além disso, o potencial imunomodulador das células foi investigado com a avaliação citológica de um raspado antes e após o tratamento com as células, tendo em vista o controle da evolução do processo inflamatório. **Material e métodos:** Dois animais de espécie canina, sexo feminino da raça *Golden Retriever* provenientes do canil da Faculdade de Medicina Veterinária com idade média de sete anos e em grau crônico de KCS foram selecionados. Após a seleção, esses animais foram submetidos ao tratamento com células-tronco de membrana amniótica após aprovação pelo comitê de ética CEUA/Vet nº 3122/2013. As células-tronco de membrana amniótica foram injetadas em ambas as glândulas lacrimais da terceira pálpebra, duas vezes com intervalo de 30 dias cada. Na primeira injeção foram utilizadas  $0,5 \times 10^6$  células em cada glândula e na segunda  $1 \times 10^6$ . Após o tratamento, os animais foram avaliados semanalmente por exame oftalmológico e testes oftálmicos. **Resultados:**

Antes da injeção celular, os dois animais incluídos no estudo foram submetidos a um exame oftalmológico que novamente confirmou o padrão crônico da KCS (Tabela 1).

**Tabela 1** - Resultados da avaliação oftalmológica dos animais incluídos no tratamento com células-tronco de membrana amniótica antes da injeção nas caninas 1 e 2

Testes/Avaliação Oftalmológica	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	02/03	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração +++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	11/13	13/11
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Mudanças significativas não foram observadas nos parâmetros oftalmológicos após sete dias de tratamento. Entretanto, o aspecto das glândulas lacrimais destes animais se apresentaram mais próximos da normalidade após sete dias do tratamento (tabela 2).

**Tabela 2** - Resultados da avaliação oftalmológica após sete dias de tratamento com as células-tronco de membrana amniótica nas caninas 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	03/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração: ++ AO	Degeneração: +++ AO
PIO	12/13	13/13
Aspecto corneano	Opacidade: ++OD +++OE Pigmentação: +++ AO	Opacidade: ++++ AO Pigmentação: ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Conforme mostra a tabela 3, após 14 dias de tratamento com as células-tronco, os dois animais apresentaram um aumento no teste de Schirmer, sendo este bem mais significativo no animal 1. Além disso, a secreção mucopurulenta mostrou-se reduzida nos olhos do animal 2.

**Tabela 3** - Resultados da avaliação oftalmológica 14 dias após tratamento com células-tronco de membrana amniótica nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	09/09	00/01
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação ++++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Após 21 dias da implantação, a quantidade da secreção continuava a mesma, porém houve uma redução em torno de 50% no teste lacrimal de Schirmer. Nenhuma mudança no aspecto das glândulas lacrimais da terceira pálpebra essa fase foi distinta do observado aos após sete dias de tratamento.

**Tabela 4** - Resultados da avaliação oftalmológica aos 21 dias de tratamento dos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	+++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	04/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração +++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++ OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação +++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

O exame oftalmológico 30 dias após implantação demonstrou que o Teste de Schirmer apresentou valores iguais ao do início do estudo e as glândulas lacrimais da terceira pálpebra voltaram também ao seu aspecto inicial, ou seja, o que eram antes da implantação. No entanto, notou-se nos dois animais a

pigmentação corneana encontrava-se menos homogênea (Tabela 5).

**Tabela 5** - Resultados da avaliação oftalmológica 30 dias após implantação das células-tronco nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD Reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	04/05	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação +++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

Nesta mesma ocasião, 30 dias após injeção foi realizada nova aplicação com cerca de 1.000.000 de células-tronco em cada glândula lacrimal da terceira pálpebra. Após sete dias dessa nova injeção houve uma redução no teste de Schirmer do cão1, a menos afetada foi observada. O teste de Schirmer também se apresentou reduzido, porém notou-se que a secreção mucopurulenta também foi reduzida significativamente não voltando ao estágio inicial, principalmente no cão2, a mais afetada.

**Tabela 6**. Resultados da avaliação oftalmológica aos sete dias após a segunda implantação das células-tronco nos animais 1 e 2

Testes/exames	Cão 1	Cão 2
Secreção mucopurulenta	++ AO	++ AO
Teste de Ameaça	Positivo OD reduzido OE	Reduzido AO
Teste de movimento	Reduzido AO	Negativo AO
Teste de Schirmer	02/03	00/00
Teste de Butt	Incerto	Incerto
Aspecto das glândulas	Degeneração ++ AO	Degeneração ++++ AO
PIO	13/14	12/09
Aspecto corneano	Opacidade ++ OD +++OE Pigmentação +++ AO	Opacidade ++++ AO Pigmentação +++ AO

AO= ambos olhos; OD=olho direito; OE=olho esquerdo; PIO=Pressão intraocular. Score da intensidade variando de + a ++++

**Conclusão:** Após a injeção das células-tronco de membrana amniótica houve melhora no teste de Schirmer após quinze dias da inoculação, porém ao longo do período de tratamento não foi observada melhora clínica significante. Entretanto, o aspecto da glândula foi diferenciado, e a secreção mucopurulenta apresentou redução na sua quantidade desde a primeira semana de tratamento. Diante destes resultados pode-se concluir que o estágio crônico o qual os animais se encontravam pode ser um fator limitante tornando a KCS irreversível nesses casos. Dessa forma precisa ser avaliado, o tratamento de animais que estejam em estágios menos avançados da doença.

## SUSCEPTIBILIDADE DE HAMSTERS FRENTE À INFECÇÃO PELO HERPESVIRUS EQUINO TIPO 1 CAUSANDO ENCEFALITE E DOENÇA RESPIRATÓRIA

ARÉVALO, A.F.<sup>1</sup>; MORI, E.<sup>1,2</sup>; MORI, C.M.C.<sup>1</sup>; CUNHA, E.M.S.<sup>3</sup>; LARA, M.C.C.S.H.<sup>3</sup>; VILLALOBOS, E.M.C.<sup>3</sup>; MIYASHIRO, S. I.<sup>1</sup>; ZANATTO, D. A.<sup>1</sup>; TONIETTI, P.O.<sup>1</sup>; GAMON, T.H.<sup>1</sup>; MAIORKA, P.C.<sup>1</sup>

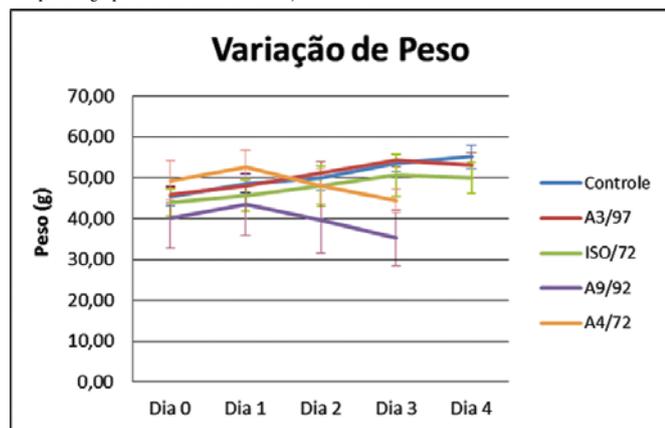
1. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil
2. Instituto Pasteur, São Paulo, SP, Brasil
3. Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brasil

**Introdução e objetivos:** O herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) é um patógeno de suma importância, responsável por perdas significativas nos plantéis, fato que, sob o ponto de vista econômico, o torna uma ameaça potencial à criação mundial de cavalos uma vez que a sua distribuição é cosmopolita. Esse vírus tem sido identificado como a causa de abortamentos, mortalidade neonatal, doença respiratória e manifestações neurológicas em cavalos [1,2]. Modelos experimentais de infecção pelo EHV-1 utilizando roedores, como camundongos e hamsters, são úteis para o estudo da resposta

do hospedeiro ao vírus, pois muitos dos aspectos da etiopatogenia da doença nessas espécies se assemelham aos observados no hospedeiro natural [3]. O camundongo é um excelente modelo para estudo da etiopatogenia da encefalite causada por estirpes neuropatogênicas do herpesvírus equino tipo 1 (EHV-1) [4]. No entanto, pesquisas recentes evidenciaram que a infecção estabelecida pela via intranasal em hamsters resultou em sintomas mais agudos e severos do que nos camundongos, sugerindo uma maior susceptibilidade da espécie ao agente [5,6]. Com base nesses dados, o presente trabalho foi delineado para avaliar as alterações respiratórias e neurológicas decorrentes da infecção pelo EHV-1 em hamsters, comparando a susceptibilidade desse modelo com estudos realizados em camundongos e equinos. **Materiais e métodos:** Hamsters Sírios machos, com três semanas de idade, foram infectados pela via intranasal com estirpes do EHV-1, obtidas de fetos abortados e potros infectados pelo vírus (A4/72, A9/92, A3/97 e ISO/72). Os hamsters foram pesados e examinados diariamente observando-se o aparecimento de manifestações neurológicas e/ou respiratórias da doença. De acordo com o aparecimento dos sintomas, grupos de cinco hamsters foram submetidos à eutanásia por overdose de isoflurano e deles foram coletados os materiais: SNC, pulmões, timo, fígado e baço que foram encaminhados tanto para a realização de isolamento viral em cultura de células E-dermal como para exame histopatológico. Em uma segunda etapa que também utilizou cinco hamsters por grupo, inoculados com as mesmas estirpes virais, após eutanásia por aplicação intraperitoneal de overdose de cetamina e xilazina, foi realizada para a obtenção do lavado bronco-alveolar (LBA). Foi determinada a contagem total e diferencial de glóbulos brancos a partir do LBA dos hamsters. **Resultados e discussão:** De forma similar aos experimentos realizados com camundongos, os hamsters desafiados com as estirpes A4/72 e A9/92 apresentaram manifestações clínicas severas no 3º dia pós-inoculação (dpi) tais como a perda de peso representada no gráfico 1, apatia, dispnéia, desidratação, decúbito e morte. Também foram observados sinais neurológicos como hiperexcitabilidade, paralisia espástica, perda de propriocepção, andar em círculos e convulsões. Ao contrário do modelo murino, em que não foi desenvolvida a doença, os hamsters inoculados com as estirpes A3/97 e ISO/72 apresentaram sintomas clínicos e neurológicos no 4º dpi, onde as alterações respiratórias foram as mais evidentes, com destaque para a epistaxe. O isolamento do vírus do SNC foi positivo em todos os animais; no entanto, os pulmões foram positivos apenas nos grupos infectados pelas estirpes A9/92 e A4/72. Nos demais órgãos houve variação de resultado entre os grupos como visualizado na tabela 1. O LBA mostrou que a contagem total de leucócitos apresentou maior número de células brancas nos hamsters infectados por A4/72 quando comparado com A9/92, A3/97 e ISO/72 e grupo controle. Entretanto, o aumento de leucócitos total encontrado nos grupos de hamsters inoculados não foi significativo ( $p > 0,05$ ) quando comparado ao valor de leucócitos total do grupo controle. Macrófagos ativados com citoplasma bastante vacuolizado, alguns deles contendo grânulos intracitoplasmáticos e uma grande quantidade de eritrócitos foi observada em esfregaços da maioria dos animais inoculados ao contrário dos esfregaços do grupo controle, que em sua maior parte apresentou apenas células macrofágicas de citoplasma vacuolizado e raros eritrócitos. Os valores apresentados na tabela 2 revelam que a contagem total e diferencial de leucócitos variou tanto entre as estirpes como também entre os indivíduos de um mesmo grupo. De modo semelhante ao descrito em cavalos em experimentos de inoculação com EHV-1 [7], na contagem diferencial no LBA notou-se nos hamsters infectados apresentaram um aumento no número de neutrófilos acompanhado de um decréscimo de macrófagos, enquanto no grupo controle a célula predominante foi o macrófago variando de 90 a 100% da contagem total dos leucócitos como observado na tabela 2. Os grupos de hamsters infectados por A3/97 e A4/72 apresentaram um aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de neutrófilos, porém, apenas o grupo infectado por A3/97 apresentou uma diminuição significativa de macrófagos

( $p < 0,01$ ) enquanto o grupo infectado por A4/72 apresentou uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ), quando ambos foram comparados ao grupo controle. Os hamsters infectados por ISO/72 apresentaram um aumento significativo de neutrófilos e uma diminuição significativa de macrófagos. Entretanto, os hamsters inoculados por A9/92 apresentam um aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) de neutrófilos e uma diminuição não significativa de macrófagos. A diferença encontrada nos números de linfócitos e monócitos entre os grupos inoculados e o grupo controle não foi significativa.

**Gráfico 1** - Comparação de peso entre os grupos de hamsters inoculados estirpes do herpesvirus equino do tipo I e o grupo controle desde a inoculação até eutanásia



**Tabela 1** - Isolamento das estirpes do EHV-1 em Sistema Nervoso Central (SNC), pulmões, fígado, timo e baço coletados após eutanásia ou morte súbita dos hamster infectados

Estirpes	ISOLAMENTO VIRAL DO EHV-1					Dia da Coleta
	SNC	Pulmões	Fígado	Baço	Timo	
A3/97	5/5	0/5	4/5	2/5	0/5	4º dpi
ISO/72	4/4	0/4	0/4	4/4	0/4	4º dpi
A9/92	5/5	5/5	5/5	5/5	1/5	3º dpi
A4/72	5/5	5/5	2/5	3/5	3/5	3º dpi

**Tabela 2** - Média e desvio padrão da contagem de leucócitos total e diferencial no lavado broncoalveolar de hamsters do grupo controle e dos grupos experimentais inoculados por via intranasal com o EHV-1. Entre parênteses encontram-se os valores mínimos e máximos observados em cada grupo

Estirpes virais	Contagem Diferencial (%)			Contagem Total
	Macrófago	Neutrófilo	Linfócito	Células/mL
Controle	98 ± 4 (90-100)	0 ± 1 (0-1)	2 ± 4 (0-10)	128 ± 42 (92-193)
A3/97	61 ± 24 (21-92)	23 ± 20 (2-59)	10 ± 12 (0-34)	170 ± 90 (93-330)
A9/92	95 ± 4 (87-100)	2 ± 2 (0-5)	1 ± 2 (0-6)	119 ± 47 (53-200)
ISO/72	63 ± 24 (35-94)	32 ± 18 (6-47)	5 ± 9 (0-18)	193 ± 28 (175-225)
A4/72	71 ± 20 (37-99)	27 ± 23 (0-69)	2 ± 3 (0-7)	215 ± 227 (53-690)

**Conclusão:** Os sintomas e os sinais clínicos observados durante o experimento indicaram que o hamster é a espécie mais susceptível frente à infecção causada pelo EHV-1, quando comparada ao modelo murino. Além disso, notou-se que a resposta dos macrófagos alveolares do hamster frente à infecção pelo EHV-1 foi similar a do equino, o que torna a espécie um atrativo modelo experimental para posteriores estudos com o agente viral.

**Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

## Referências

- QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONELLY, W. J.; LEONARD, F. C. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- MORI, E. *Infeção experimental em cavalos pelo herpesvirus equino tipo 1: aspectos clínicos e detecção do agente pela reação em cadeia pela polimerase*. 2005. 159 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

TSUJIMURA K., YAMANAKA T., KONDO T., FUKUSHI H., MATSUMURA T. Pathogenicity and immunogenicity of equine herpesvirus type 1 mutants defective in either gI or gE gene in murine and hamster models. *Journal of Veterinary Medicine and Science*. V. 68, n. 10, p. 1029-1038, 2006.

MORI, C.M.C.; MORI, E.; FAVARO, L.L.; SANTOS, C.R.; LARA, M.C.C.S.; VILLALOBOS, E.M.C.; CUNHA, E.M.S.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; MAIORKA, P.C. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. *Journal of Comparative Pathology*, v. 146, n. 2-3, p. 202-210, 2012.

EL-HABASHI, N.; EL-NAHASS, E.; FUKUSHI, H.; NAYEL, M.; HIBI, D.; SAKAI, H.; YANAI, T. Effects of equine herpesvirus-9 infection in pregnant mice and hamsters. *Journal of Comparative Pathology*, v. 144, n. 2-3, p. 103-112, 2011a.

EL-HABASHI, N.; MURAKAMI, M.; EL-NAHASS, E.; HIBI, D.; SAKAI, H.; FUKUSHI, H.; SASSEVILLE, V.; YANAI, T. Study on the infectivity of equine herpesvirus 9 (EHV-9) by different routes of inoculation in hamsters. *Veterinary Pathology*, v. 48, n. 3, p. 558-564, 2011b.

KYDD, J.H.; HANNANT, D.; MUMFORD, J.A. Residence and recruitment of leucocytes to the equine lung after EHV-1 infection. *Veterinary Immunology Immunopathology*. v. 52, n. 1-2, p. 15-26, 1996.

## DETECÇÃO DE ESTIRPES VIRULENTAS DE *ARCOBACTER BUTZLERI* EM CARNES DE FRANGOS E SUÍNOS PROVENIENTES DE AÇOGUES NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO (PROJETO EM ANDAMENTO)

OLIVEIRA, M.G.X.<sup>1</sup>, MORENO, A.M.<sup>1</sup>, SPINDOLA, M.G.<sup>1</sup>, GOMES, V.T.M.<sup>1</sup>, FILSNER, P.H.L.<sup>1</sup>, FERREIRA, T.S.P.<sup>1</sup>, KNÖBL, T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FMVZ-USP - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP (Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 Cidade Universitária CEP 05508 270).

**Introdução:** *Arcobacter* spp. são bactérias Gram negativas pertencentes à família Campylobacteraceae que possuem características distintas em sua forma de multiplicação, uma vez que apresentam temperatura de crescimento ótima a 30°C de 24h às 48h em microaerofilia ou aerobiose [1]. Até o presente momento, foram descritas dezessete espécies de *Arcobacter* isoladas de diferentes origens, contudo apenas as espécies *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas zoonoses, representando um grupo de agentes patogênicos causadores de toxi-infecções alimentares em seres humanos [2]. A presença deste patógeno em produtos de origem animal representa um risco à saúde dos consumidores, sendo uma preocupação para o setor de produção. Apesar dos mecanismos de patogenicidade do *Arcobacter* spp. e de seus fatores de virulência serem pouco conhecidos, alguns autores consideram como importantes a produção de alfa hemolisinas [3], a produção de toxinas e a capacidade de invasão em culturas celulares HEP-2 [4, 5, 6]. Atualmente o Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango [7] e quarto produtor e exportador de carne suína [8]. Para manter a taxa de crescimento e valorização, os setores de produção devem estar atentos ao aumento das exigências dos consumidores externos, em vários quesitos, dentre os quais se destacam a qualidade sanitária dos plantéis e a segurança dos alimentos de origem animal [9, 10]. O presente foi delineado para investigar a presença de bactérias do gênero *Arcobacter* em recortes de carnes de aves e suínos comercializadas no Município de São Paulo; bem como de identificar a espécie *A. butzleri* e determinar a presença de fatores de virulência nas estirpes isoladas, com o emprego da reação em cadeia pela polimerase. **Material e métodos:** Foram coletados 300 cortes de peito, asa, coxa e sobrecoxa de carne de frango e 300 de costela, lombo, bisteca e pernil de carne de suínos procedentes de mercados municipais e açougues de São Paulo. As amostras foram transportadas até o laboratório sob-refrigeração e processadas no mesmo dia da coleta. Para controle de qualidade dos meios e da reação em cadeia pela polimerase foram utilizadas estirpes de referência *A. butzleri* ATCC 49616, *A. cryaerophilus* ATCC

43158 e *A. skirrowii* ATCC 51132. Os cortes foram pesados e amostras de 25g de carne foram acondicionadas em bolsas esterilizadas contendo 225 mL de água peptonada tamponada que foram posteriormente homogenizadas por 1min em *stomacher*. Uma alíquota de 1 mL da água peptonada foi semeada em 9 mL no caldo de enriquecimento seletivo descrito por [11] e os tubos foram incubados em aerobiose por 48h a 30°C. Após o período de incubação uma alíquota de 10µL do caldo foi depositada sobre uma membrana estéril de celulose (0,45µm) colocada na superfície do ágar seletivo JM. Após uma hora, o filtro foi retirado e a placa de ágar foi estriada e incubada por 48 a 72h a 30°C. Colônias pequenas, típicas, não hemolíticas foram submetidas à coloração de Gram e à identificação com a reação em cadeia pela polimerase (PCR) e estocadas a -80°C. Os primers descritos por [12] foram utilizados para a caracterização do *Arcobacter* spp. e do *A. butzleri*. A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA bacteriano, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 pmoles de cada *primer*, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação à 94°C por quatro minutos seguido por 35 ciclos de um minuto à 94°C, um minuto à 55°C e um minuto à 72°C. Foi realizada a pesquisa de nove genes de virulência, com a utilização dos pares de *primers* descritos por [13]: *ciaB*, *cj1349*, *cadF*, *irgA*, *hecA*, *hecB*, *mviN*, *pldA* e *tlyA*. **Resultados:** Até o momento, foram examinados 115/300 cortes de carne de suínos e 105/300 de carne de frangos, a presença de *Arcobacter* spp. foi confirmada em 10,4% (12/115) de amostras de carne de suínos e 4,7% (5/105) de carne de aves. Desta triagem foram obtidas 5/12 (41,6%) e 4/5 (80%) estirpes positivas para *Arcobacter butzleri*, provenientes, respectivamente, dos cortes de suínos e aves. Considera-se relevante a detecção do agente nos produtos de origem animal, uma vez que se trata de um patógeno emergente e com caráter zoonótico [14]. Os genes de virulência *pldA*, *cadF*, *ciaB* e *cj 1349*, estiveram presentes em 100% dos isolados de origem suína e aviária. Apesar da virulência de *Arcobacter* spp. ser pouco elucidada, a sua capacidade de adesão e invasão são consideradas fundamentais na patogenicidade do agente [15]. Estudos [16] levantam a hipótese da ação hemolítica do agente no organismo, intensificada pela presença do gene estrutural *pldA* codificador da membrana de fosfolipase A. Os genes pesquisados neste estudo estão associados aos fatores encontrados em estirpes provenientes de humanos de diversas origens do mundo, como é destacado no trabalho realizado por [17], que descreve a presença de *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* em alimentos de origem animal do Sul do Iran e seis (6) fatores de virulência que conferem importância zoonótica ao patógeno. A pesquisa dos fatores de virulência encontra-se em fase de execução e novos genes devem ser pesquisados na continuidade do projeto.

**Conclusão:** A confirmação da presença de *Arcobacter butzleri* na fase final de comercialização de carnes de frangos e suínos em açougues no município de São Paulo, Brasil representa relevante risco a população. A falta de inocuidade de alimentos cárneos é motivo de preocupação, pois apesar de *Arcobacter* ser facilmente eliminado em temperatura de 55°C, existe o risco de contaminação cruzada com utensílios e outros produtos alimentares não cozidos. Os resultados preliminares do presente trabalho revelam a presença de estirpes com potencial patogênico conforme os fatores de virulência pesquisados. No Brasil, os isolamentos de *Arcobacter* em amostras de carcaça de frangos têm sido realizados apenas por grupos de pesquisa da região Sul do país, o que reforça a importância de novos estudos em outros estados brasileiros, com a finalidade de complementar as evidências obtidas nesta pesquisa.

**Agradecimentos:** À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e as agências de fomento FAPESP (2014/07837-6 e 2014/06584-7) e CAPES.

## Referências

Snelling, W. J.; Matsuda, M.; Moore, J. E.; Dooley, J. S. G. 2006. Under the microscope: *Arcobacter* Letters in Applied Microbiology, 42, 7-14.

Newell, D.G. 1997. *Campylobacters, Helicobacters* and Related organisms-disease associations in pigs. The Pig Journal, 39,102.

Atabay, H. I.; Bang, D. D.; Aydin, F.; Erdogan, H. M.; Madsen, M. 2002. Discrimination of *Arcobacter butzleri* isolates by polymerase chain reaction-mediated DNA fingerprinting. Letters in Applied Microbiology, 35, 141- 145.

Fernández, H.; Eller, G.; Paillacar, J.; Gajardo, T.; Riquelme, A. 1995. Toxigenic and invasive capacities: possible pathogenic mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 90, 633-634.

Villarruel-López, A.; Márquez-González, M.; Garay-Martinez, E.; Zepeda, H.; Castillo, A.; Mota, L.; Murano, E.; Torres-Vitela, R. 2003. Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero Cells. Journal of Food Protection, 66, 1374-1378.

Ho, T. K. H.; Lipman, L. J. A.; Hendriks, G. C. J. M. H.; Tooten, P. C. J.; Ultee, T.; Gastra, W. 2007. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. FEMS Immunology Medicine Microbiology, 50, 51-58.

UBABEF-União Brasileira de Avicultura. Excelência Sanitária. Disponível no site: [http://www.ubabef.com.br/a\\_avicultura\\_brasileira/excelencia\\_sanitaria](http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/excelencia_sanitaria). Acesso em 30 de outubro de 2013.

Souza, J.C.P.V.B.; Amaral, A.L.; Morés, N.; Treméa, S.L.; Miela, M.; Filho, J.I.S. 2013. Sistema de Produção de Leitões baseado em Planejamento, Gestão e Padrões Operacionais, Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC.

Mendes, A.S.; Moura, D.J.; Naas, I.A. Produção Industrial de perus: características e exigências. *Avisite. Ciência e Tecnologia*, 2011. Disponível em <http://www.avisite.com.br/cet/trabalhos.asp?codigo=71>. Acesso em 23 De março de 2014.

Marietto-Gonçalves, G.A.; Andreatti-Filho, R.L. 2010. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus domesticus* - Linnaeus, 1758) com colibacilose. Arquivos do Instituto Biológico, 77, 715-718.

Johnson, L. G.; Murano, E. A.1999. Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. Journal of Food Protection, 62, 5, 456-462.

Doudiah, L.; De Zutter, L.; Vandamme, P.; Houf, K. 2010. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. J. Microbiol. Methods, 80, 281-286.

Doudiah, L.; Zutter, L.; Baré, J.; De Vos, P.; Vandamme, P.; Vandenberg, O.; Abeele, A.M.V.; Houf, K. 2012. Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. Journal of Clinical Microbiology, 50, 3, 735-741.

Ho Ht, Lipman Lj, Gastra W. 2006. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! Vet. Microbiology, v.115, p.1-13.

Collado, L.; Fugueras, M.J. 2011. Taxonomy, Epidemiology and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. Clinical Microbiology Reviews, p.174-192.

Grant KA, Belandia IU, Dekker N, Richardson PT, Park SF. 1997. Molecular characterization of *pldA*, the structural gene for a phospholipase A from *Campylobacter* and *E. coli*, and its contribution to cell-associated hemolysis. Infect. Immun, 65, 1172-1180.

Tabatabaei, M.; Aski, H.S.; Shayeg, H. ; Khoshbakht, R. 2014. Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. Microbial Pathogenesis, 66, 1-4.

## MESTRADO - CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

### A EXPOSIÇÃO DE RATOS À FUMAÇA DO CRACK EM UM NOVO DISPOSITIVO DE EXPOSIÇÃO PULMONAR RESULTA EM ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

PONCE, F.1; KIRSTEN, T. B.1; MENDES, P. F.1; HUEZA, I. M.2

1 Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP, São Paulo;

2 Instituto de Ciências Ambientais Químicas e Farmacêuticas, UNIFESP, Campus Diadema.

**Introdução:** A droga de rua comercializada como *crack*, é constituída principalmente por cocaína (alcaloide tropânico com notável ação neuroestimulante) na sua forma de base livre, e atualmente vem se destacando

como um problema social e de saúde pública, uma vez que a dependência química por esta forma de cocaína se dá com maior facilidade devido a seu alto potencial de abuso e baixo custo [1]. Apesar de existirem diversos estudos em modelos animais com outras formas de cocaína, raros são os relatos científicos que investigaram o efeito da fumaça do *crack* em roedores, devido à dificuldade de ser realizada a exposição à droga pela via pulmonar. Assim, o presente foi delineado para avaliar as possíveis alterações comportamentais em campo aberto e em labirinto em T de ratos Wistar machos expostos à fumaça do *crack*, duas vezes ao dia, durante 28 dias, utilizando para tal um modelo de exposição pulmonar ao *crack*. Foram avaliados parâmetros motores, exploratórios, de ansiedade e cognitivos nos ratos. **Métodos:** Antes da realização dos estudos biológicos, foi necessária a determinação do nível de cocaína presente nas amostras de *crack* cedidas por órgão oficial de segurança pública e para tal, foi empregada a técnica de cromatografia líquida acoplada a um detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). Em um estudo prévio realizado foi determinado que a queima de 250mg de *crack* com exposição por dez minutos, conferiu aos animais os mesmos níveis séricos de cocaína que os relatados em humanos [2]. Assim, ratos Wistar adultos foram expostos por dez minutos à fumaça resultante da queima de 250 mg de *crack* por 28 dias, duas vezes ao dia. Foi avaliada a atividade geral em campo aberto com análises de parâmetros locomotores, exploratórios, de ansiedade e emocionais. Os animais também foram avaliados no labirinto em T para a averiguação de uma possível alteração cognitiva com a verificação da alternância espontânea. Todas as análises comportamentais foram efetuadas em três momentos diferentes da exposição: início (1º ao 5º dia), meio (10º ao 14º dia) e final (24º ao 28º dia) da exposição, sempre imediatamente após o término da exposição à fumaça. Além do grupo experimental exposto a fumaça da droga, e do grupo controle exposto à fumaça de cinzas de cigarro, um terceiro grupo foi avaliado, recebendo a mesma quantidade alimentar média ingerida pelos animais experimentais, chamado de *pair-fed*, devido às conhecidas propriedades anorexígenas da cocaína [3]. **Resultados:** Os resultados da análise comportamental em campo aberto (demonstrados nas tabelas 1, 2 e 3) revelaram que tanto nas avaliações no início, meio e final das exposições o grupo experimental apresentou aumento da distância percorrida e da velocidade média, comparados aos dados dos grupos controle e *pair-fed*, ocorrendo, portanto hiperlocomoção. Nesses animais experimentais houve diminuição do tempo de permanência na zona periférica e maior permanência na zona central apenas nas avaliações no meio e no final das exposições, comparadas aos dados dos grupos controle e *pair-fed*, o que revela uma aparente diminuição da ansiedade. Também apenas nas avaliações no meio e ao final das exposições foi verificado uma diminuição do tempo de auto-limpeza dos animais experimentais com relação aos controles. Tanto nas avaliações no início, meio e ao final das exposições não houve qualquer diferença estatística entre os grupos controle e *pair-fed*. Os resultados da análise comportamental em labirinto T não demonstraram qualquer alteração significativa entre os grupos, revelando aparente preservação cognitiva. Os dados relativos às análises comportamentais em campo aberto foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Tukey, os dados obtidos através da análise comportamental em labirinto em T foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e os resultados foram considerados significantes para  $p < 0,05$ .

Tabela 1 - Valores referentes à média ± desvio-padrão

ANÁLISE COMPORTAMENTAL EM CAMPO ABERTO de ratos Wistar machos expostos à fumaça do <i>crack</i> , duas vezes ao dia 1º AO 5º DIA DE EXPOSIÇÃO					
Grupo (n=10)	Distância Percorrida (cm)	Velocidade média (cm/s)	Tempo de auto-limpeza (s)	Tempo de permanência na zona central (s)	Tempo de permanência na zona periférica (s)
Controle	2811 ±521	9,4 ±1,7	27,2 ±35,2	12,9 ±11,3	286,2 ±11,3
Experimental	4165 ±1170***	13,9 ±3,9***	15,0 ±17,6	13,1 ±8,2	285,9 ±8,2
<i>Pair-fed</i>	3252 ±578	10,877 ±1,9	12,6 ±9,5	13,3 ±10,1	285,8 ±10,1

\*  $p < 0,05$  versus grupo *Pair-fed*; \*\*  $p < 0,01$  versus grupo Controle

Tabela 2 - Valores referentes a média ± desvio-padrão

ANÁLISE COMPORTAMENTAL EM CAMPO ABERTO RATOS WISTAR MACHOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO <i>CRACK</i> , DUAS VEZES AO DIA. 10º AO 14º DIA DE EXPOSIÇÃO					
Grupo (n=10)	Distância Percorrida (cm)	Velocidade média (cm/s)	Tempo de auto-limpeza (s)	Tempo de permanência na zona central (s)	Tempo de permanência na zona periférica (s)
Controle	1883 ±757	6,3 ±2,5	11,0 ±6,5	4,1 ±3,6	295,0 ±3,6
Experimental	3197 ±1211***	10,7 ±4,1***	3,3 ±3,8♦	21,2 ±22,5♦	277,8 ±22,5♦
<i>Pair-fed</i>	1847 ±787	6,2 ±2,6	12,6 ±8,5	4,7 ±6,2	294,3 ±6,2

\*  $p < 0,05$  versus grupo Controle; \*\*  $p < 0,01$  versus grupo *Pair-fed*; ♦  $p < 0,05$  versus grupos Controle e *Pair-fed*

Tabela 3 - Valores referentes à média ± desvio-padrão

ANÁLISE COMPORTAMENTAL EM CAMPO ABERTO RATOS WISTAR MACHOS EXPOSTOS À FUMAÇA DO <i>CRACK</i> , DUAS VEZES AO DIA. 24º AO 28º DIA DE EXPOSIÇÃO					
Grupo (n=10)	Distância Percorrida (cm)	Velocidade média (cm/s)	Tempo de auto-limpeza (s)	Tempo de permanência na zona central (s)	Tempo de permanência na zona periférica (s)
Controle	909 ±497	3,6 ±1,6	10,0 ±9,8	3,7 ±2,8	291,5 ±9,9
Experimental	1898 ±807***	6,3 ±2,7***	1,2 ±1,7*	16,2 ±15,3♦	275,9 ±21,5♦
<i>Pair-fed</i>	1131 ±372	3,8 ±1,2	7,8 ±8,4	1,2 ±1,5	297,5 ±2,6

\*  $p < 0,05$  versus grupo *Pair-fed*; \*\*  $p < 0,01$  versus grupo Controle; ♦  $p < 0,05$  versus grupos Controle e *Pair-fed*; ♦  $p < 0,05$  versus grupo Controle; ♦  $p < 0,05$  versus grupos Controle e  $p < 0,01$  versus *Pair-fed*

**Conclusão:** O presente estudo revelou que a exposição de roedores à fumaça do *crack* em modelo experimental determinou uma concentração sérica de cocaína semelhante à encontrada em usuários de tal droga. O modelo de exposição induziu um claro aumento na atividade motora dos indivíduos desde as primeiras exposições, aparentemente sem alterações cognitivas, efeito esse que persistiu ao longo dos dias até o término das avaliações. Além disso, a droga parece ter reduzido a emocionalidade e estresse dos animais pelas avaliações dos parâmetros de ansiedade e de auto-limpeza. Porém, essa resposta pode ter sido simplesmente em detrimento do aumento motor dos indivíduos. Outro dado interessante foi que a droga induziu um aparente efeito cumulativo, uma vez que as alterações foram mais marcantes do meio para o final das exposições. É importante ser ressaltado que as variações na ingesta alimentar nos animais experimentais não foram responsáveis pelas alterações comportamentais, mas sim a droga, uma vez que os grupos controle e *pair-fed* não apresentaram quaisquer diferenças estatisticamente significantes. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Projeto 2012/24550-7) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## Referências

- Oliveira, L.G.; Nappo, A.S. 2008. *Crack* na cidade de São Paulo: acessibilidade, estratégias de mercado e formas de uso. Revista de Psiquiatria Clínica, v. 35, p. 212-218.
- Schramm, W. et al. 1993. Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum, and urine. Clin Chem. 39 (3):481-7.

## INFLUÊNCIA DO CONSUMO DE RAÇÃO HIPERLIPÍDICA RESTRITA EM MAGNÉSIO NA ADIPOSIDADE E NA HISTOLOGIA DO TECIDO ADIPOSITIVO BRANCO DE RATOS

TEIXEIRA, P.D.S.<sup>1\*</sup>; LOBO, A.R.<sup>1</sup>; SALES, A.L.C.C.<sup>1</sup>; DE CARLI, E.<sup>1</sup>; PEREIRA, R.M.R.<sup>2</sup>; TAKAYAMA, L.<sup>2</sup>; SÁ, L.R.M.<sup>3</sup>; COLLI, C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 05508-000 São Paulo – SP, Brasil. \*E-mail: pdsteixeira@usp.br

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina– Departamento de Clínica Médica, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455 01246-903 São Paulo – SP, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Departamento de Patologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 05508-900 São Paulo – SP, Brasil.

**Introdução:** O tecido adiposo do indivíduo obeso é caracterizado pela hipertrofia e hiperplasia do adipócito, alterações responsáveis pela expansão do tecido. A hipertrofia antecede a hiperplasia e acontece para atender à necessidade de armazenamento de gordura adicional da dieta [1,2]. Estas alterações são seguidas pelo aumento da angiogênese, pela infiltração de células do sistema imunológico, pela produção elevada de matriz extracelular e pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias durante a progressão da inflamação crônica [3,4]. A expansão do tecido adiposo em indivíduos obesos, principalmente o visceral, também está associada a um quadro inflamatório crônico subclínico [5,6]. Sabe-se que um padrão alimentar caracterizado pelo consumo elevado de lipídios (com predomínio de lipídios saturados) e de carboidratos simples, associado ao consumo reduzido de fibras alimentares, de compostos bioativos e de micronutrientes, pode levar, fundamentalmente, a alterações no peso corporal [7]. Nesse aspecto tem sido sugerido que o sobrepeso e a obesidade também sejam decorrentes de inadequações alimentares em longo prazo, não apenas associadas ao excesso, mas também às deficiências nutricionais [8,9]. A avaliação do consumo alimentar de populações tem demonstrado, que indivíduos com excesso de peso apresentam baixo consumo de magnésio (Mg) [10,11,12]. Neste contexto, alterações no status de Mg, como resultado da inadequação dietética do mineral, vêm sendo associadas com alteração de indicadores de estresse oxidativo e de inflamação [13,14,15]. Desta forma, a hipótese aventada no presente trabalho é de que o consumo excessivo de lipídios resulta na expansão do tecido adiposo e promove a instalação de quadro inflamatório neste, agravado quando há associação de restrição dietética de Mg. **Material e métodos:** O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP (Protocolo CEUA nº 371). Ratos (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos, pesando entre 180-200g, da linhagem *Wistar Hannover*, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da USP, foram mantidos em gaiolas semimetabólicas individuais, de aço inoxidável, em ambiente com temperatura e umidade controladas (22°C; 55%, respectivamente), com ciclos de claro/escuro de 12 h. Rações experimentais, semipurificadas e peletizadas, baseadas na formulação descrita pela empresa Harlan Teklab Laboratories (Madison, WI, EUA) para ratos em crescimento, foram adquiridas por importação e acondicionadas em câmara fria (~4°C). As rações do grupo controle (CON) foram elaboradas com 7% de calorias provenientes de lipídeos (óleo de soja). As rações hiperlipídicas foram elaboradas com 30 g/kg de lipídeos na forma de óleo de soja, suplementada com 310 g/kg na forma de banha (aproximadamente 60% de calorias

provenientes de lipídeos), uma com concentração adequada de Mg (500 mg de Mg/Kg de ração) e outra com restrição de 70% de Mg (150 mg de Mg/Kg de ração). Após sete dias de adaptação, os animais foram distribuídos em três grupos experimentais (CON, HF [adequado em Mg] e HF[Mg] [restrito em Mg]). Ração e água (desmineralizada) foram oferecidas *ad libitum*. Após nove dias de experimento, os animais do grupo controle passaram a receber a ração *ad libitum* (CON) ou pareada (PF) pelo consumo médio (em gramas) animais dos grupos hiperlipídicos. O consumo foi registrado e calculado diariamente considerando a oferta e a sobra de ração; o peso corporal foi verificado e registrado a cada dois dias. Aos 60 dias de experimento os animais foram submetidos à eutanásia após anestesia por injeção intraperitoneal com solução de anestésicos (xilazina, 25 mg/kg; quetamina, 10 mg/kg; 1:2). Os animais foram necropsiados para exame macroscópico de órgãos. Fragmentos do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal foram coletados e fixados em solução tamponada de formalina 10%. Após fixação de 24 h, os fragmentos foram processados segundo técnica padrão e incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em cortes de 15 µm. O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz, utilizando microscópio óptico (Zeiss, modelo Primo Star, Thornwood, EUA). As imagens digitais foram adquiridas com microscópio Eclipse Ni-U (Nikon, Japão) acoplado à câmara digital refrigerada DS-U3 (Nikon, Japão) e software NIS-elements para captura de imagens. Os cortes histológicos das regiões epididimal e retroperitoneal foram analisados quanto à presença de processo inflamatório, à intensidade deste processo e o tipo celular predominante envolvido; também quanto à presença de estruturas *crown-like*, adipócitos multivacuolizados e alterações circulatórias. A intensidade das alterações histopatológicas foi avaliada semiquantitativamente na escala de 0 a 3, onde: 0 = parâmetro tido como dentro da normalidade, 1 = alterações mínimas, 2 = alterações em grau moderado e 3 = alterações em grau marcante. O tamanho do adipócito (volume e área) foi medido com o emprego do recurso de contagem do *software* Image J (National Institute of Health, Maryland, USA), após decalque das células e remoção do fundo. **Resultados:** Após o dia nove de experimento, os grupos controle e os dois grupos hiperlipídicos apresentaram diferenças no consumo de ração; por este motivo, foi criado um grupo controle pareado, de modo que o consumo de ração entre os grupos pudesse ser comparado. Ao final do experimento foi observado maior ganho de peso dos animais dos grupos hiperlipídicos quando comparados ao grupo PF sem, contudo, existir diferenças entre si (grupos HF e HF[Mg]). Como esperado, o grupo HF[Mg] teve menor ingestão de Mg em relação a todos os grupos, sendo que o consumo de Mg do grupo HF foi semelhante ao do PF.

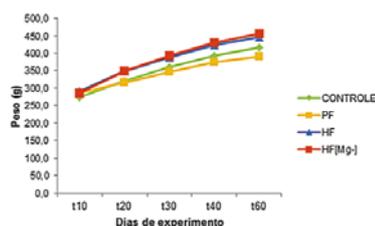
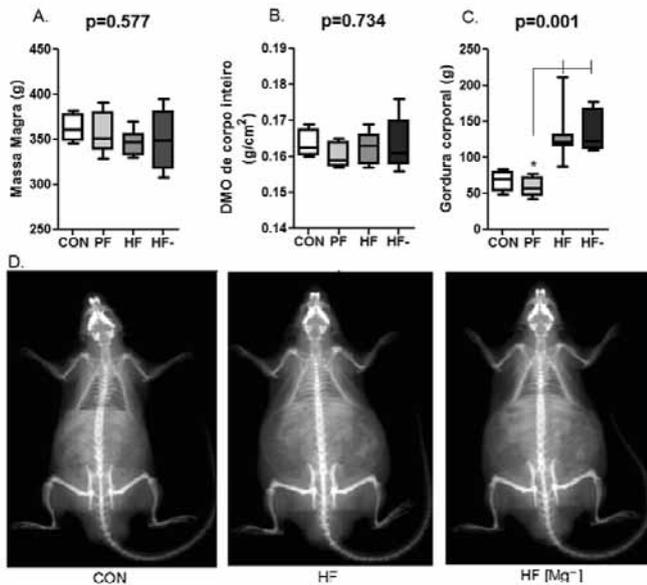


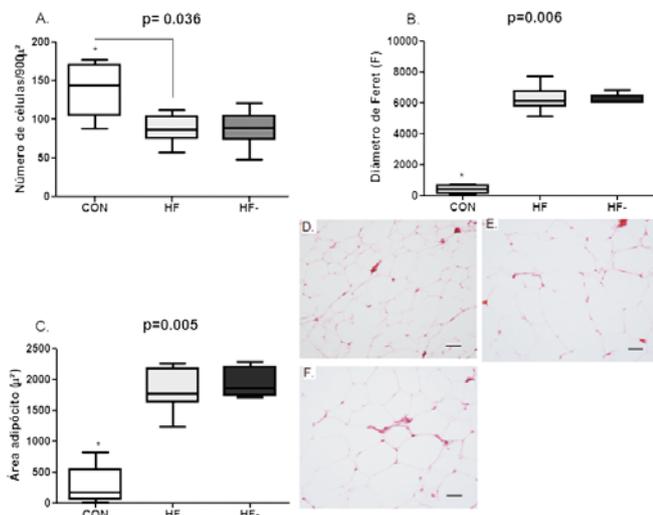
Figura 1 - Evolução do ganho de peso de animais que receberam rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF[Mg]) durante 60 dias de experimento

Foi observado maior peso de gordura corporal nos animais dos grupos hiperlipídicos em relação aos do grupo PF, independentemente da restrição de Mg.



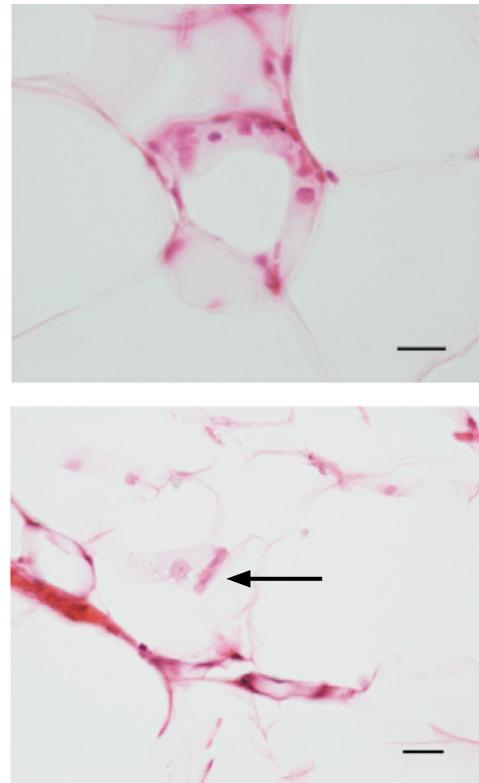
**Figura 2** - Composição corporal de ratos alimentados com rações controle (CON e PF) e hiperlipídicas adequada ou restrita em Mg (HF e HF[Mg-]) após 52 dias de experimento. Em (A) massa magra (g), em (B) Densidade mineral óssea (DMO) (g/cm<sup>2</sup>), em (C) gordura corporal (g). Em (D) imagem gerada pelo DXA, ilustrando aumento de gordura corporal na região abdominal dos animais dos grupos que receberam ração hiperlipídica. Valores considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ . A comparação entre os grupos foi feita usando o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de post-hoc de Dunns

Observou-se maior número (por campo de 900μ<sup>2</sup>) e menor área de adipócitos no tecido adiposo dos animais do grupo controle em relação aos dos grupos hiperlipídicos. Estes resultados foram confirmados pelo maior diâmetro de Feret (grupos HF), medida definida como a distância entre duas linhas tangenciais paralelas e usada para avaliar projeções de um objeto tridimensional sobre um plano bidimensional, estimando o volume da célula.



**Figura 3** - Parâmetros histomorfométricos e aspecto histológico do tecido adiposo branco retroperitoneal de ratos que receberam rações controle (CON) e hiperlipídicas adequada (HF) ou restrita em Mg (HF). Em (A) observa-se a comparação do número de adipócitos por campo microscópico de 900 μ<sup>2</sup>; em (B) o diâmetro de Feret e em (C) a área do adipócito. Estas medidas foram obtidas por ferramenta do software Image J, a contagem de células foi feita manualmente. O teste estatístico utilizado foi Kruskal-Wallis, seguido do post-hoc de Dunns. De D-F: Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal. Observar tamanho e número de adipócitos no campo de 20x. D. Grupo CON; E. Grupo HF; F. Grupo HF-. HE, barra= 100 μm

O exame histopatológico do tecido adiposo revelou focos de esteatite com predomínio de macrófagos e de células adiposas com citoplasma multivacuolizado nos grupos HF, independente da restrição de Mg.



**Figura 4** - Fotomicrografia do tecido adiposo retroperitoneal dos animais do grupo HF. (A) Foco de esteatite discreta com predomínio de macrófagos; (B) Em destaque, adipócito com citoplasma multivacuolizado. HE, barra= 25 μm

**Conclusão:** O consumo de dieta hiperlipídica nas condições experimentais testadas foi suficiente para promover expansão do tecido adiposo, secundária à hipertrofia do adipócito, independentemente da restrição dietética de Mg. Entretanto, esta alteração não foi acompanhada por processo inflamatório evidente. Nas condições experimentais deste estudo a restrição de Mg não agravou as alterações observadas. **Agradecimentos:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo No. 2012/16284-5) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Processo No. 481539/2012-3).

### Referências

FAUST, I.M.; JOHNSON, P.R.; STERN, J.S.; HIRSCH, J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *American Journal of Physiology*, v.235, 1978.

JO, J.; GAVRILOVA, O.; PACK, S.; JOU, W.; MULLEN, S.; SUMNER, A.E.; CUSHMAN, S.W.; PERIWAL, V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Computational Biology*, v.5, 2009.

OUCHI, N.; PARKER, J.; LUGUS, J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disorders. *Nature reviews*, v.11, 2011.

SUGANAMI, T.; OGAWA, Y. Adipose tissue macrophages: their role in adipose tissue remodeling. *Journal of Leukocyte Biology*, v.88, 2012.

HAGITA, S.; OSAKA, M.; SHIMOKADO, K.; YOSHIDA, M. Adipose inflammation initiates recruitment of leukocytes to mouse femoral artery: role of adipose-vascular axis in chronic inflammation. *Plos One*, v.6, n.5, 2011.

KARALIS, K.P.; GIANNOGONAS, P.; KODELA, E.; KOUTMANI, Y.; ZOUMAKIS, M.; TELI, T. Mechanisms of obesity and related pathology: linking immune responses to metabolic stress. *FEBS Journal*, v. 276, 2009.

BES-RASTROLLO, M.; DAM, R.M.; MARTINEZ-GONZALES, M.A.; LI, T.Y.; SAMPSON, L.L.; HU, F.B. Prospective study of dietary energy density and weight gain in women. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.88, 2008.

ALBEIRT, K.G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet*, v.366, 2005.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

CAHILL, E.; SHAHIDI, M.; SHEA, J.; WADDEN, D.; GULLIVER, W.; RANDELL, E.; VASDEV, S.; SUN, G. High Dietary Magnesium Intake Is Associated with Low Insulin Resistance in the Newfoundland Population. *Plos One*, v. 8, n.3, 2013.

JARVANDI, S.; GOUGEON, R.; BADER, A.; DASGUPTA, K. Differences in food intake among obese and nonobese women and men with Type 2 Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 30, n.4, 2011.

MOIZÉ, V.; DEULOFEU, R.; TORRES, E.; OSABA, J.M.; VIDAL, J. Nutritional intake and prevalence of nutritional deficiencies prior to surgery in a spanish morbidly obese population. *Obesity Surgery*, v. 21, 2011.

## O ENVOLVIMENTO DO C-TERMINUS DA PROTEÍNA S100A9 NA ANGIOGÊNESE, FORMAÇÃO DE TUBOS E PROGRESSÃO TUMORAL

MORAES, N.F.<sup>1</sup>; MELO, R.L.<sup>2</sup>; SAMPAIO, S.C.<sup>1</sup>; GIORGI, R<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Fisiopatologia, Instituto Butantan, Brasil

<sup>2</sup>Laboratório de Proteômica Funcional, Instituto Butantan, Brasil

**Introdução:** Foi demonstrado que tanto a proteína S100A9 inteira, quanto o peptídeo sintético idêntico à porção C-terminal dessa proteína murina (pS100A9m) induzem efeito antinociceptivo em modelos de dor inflamatória [1]. Ainda, o pS100A9m inibe as funções de células peritoneais aderentes de camundongo [2; 3], células estas cruciais na interação entre as células tumorais e as células estromais no microambiente tumoral. O crescimento do tumor não é dependente apenas das células tumorais, mas às interações entre essas células, matriz extracelular e células do estroma, resultando em metástase [4]. Foi demonstrado que o complexo S100A8/A9 tem sido constantemente associado à malignidade [5]. Ainda, ensaios realizados *in vitro* demonstraram que o complexo S100A8/A9 em altas concentrações 20–250µg/ml (aproximadamente 1–10µM) exibe propriedades inibitórias sobre o crescimento de diferentes tipos de células tumorais de camundongos e humanas, além de promover a citotoxicidade e apoptose destas células [6]. Apesar dessas evidências, até o momento ainda não foi investigado o efeito do pS100A9m sobre a progressão tumoral e angiogênese. Portanto, o objetivo do presente estudo foi a avaliação do efeito *in vitro* do peptídeo da S100A9m em eventos envolvidos na angiogênese e crescimento tumoral. **Material e métodos:**

**Proliferação:** 5x10<sup>4</sup> células endoteliais tímicas (tEnd.1) foram incubadas por 1h com meio RPMI ou com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço). Depois, as células foram incubadas por 24h com RPMI, coradas com azul de Tripán e contadas em câmara de Neubauer. As células de tumor de Walker 256 (LLC) foram tratadas com o pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço nas mesmas condições. **Migração (wound healing):** 1x10<sup>6</sup> células tEnd.1 foram plaqueadas em laminulas sensibilizadas com colágeno tipo I e após sua confluência foi realizada a interrupção da monocamada celular. As células foram incubadas com RPMI ou com o pS100A9m nas mesmas concentrações mencionadas acima por 1h. Em seguida, incubadas apenas com RPMI 1% por 24h. Células migradas para o espaço vazio foram contadas em microscopia de luz. **Adesão:** Placas sensibilizadas com fibronectina-3µg/poço, colágeno tipo I-10µg/poço ou laminina-10µg/poço foram incubadas por 1h com BSA 1%. Células tEnd.1 (1x10<sup>5</sup>), pré-tratadas ou não por 1h com pS100A9m (0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço), foram aderidas por 1h às placas. Depois, foram incubadas com MTT por 3h e com SDS por 18h e a adesão avaliada por ELISA. **Formação de tubos:** Placas polimerizadas com Matrigel foram incubadas por até 6h com 2,5x10<sup>4</sup> células tEnd.1, pré-tratadas ou não por 1h com o pS100A9m (2,35 ou 4,7µM/poço). Em outro experimento, o pS100A9m permaneceu no ensaio por todo o período da formação dos tubos.

As formações tubulares foram fotografadas em microscopia de luz e contadas.

**Resultados:** Ensaio de proliferação: As concentrações de 0,585; 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço do pS100A9m foram capazes de inibir a proliferação de tEnd.1, quando comparadas ao grupo controle. Suas porcentagens de inibição foram 51%, 36%, 56% e 43%, respectivamente. Já a concentração de 9,4µM/poço do peptídeo não alterou a proliferação das células endoteliais - Figura 1. Em relação à proliferação de células LLC, o pS100A9m inibiu esse parâmetro nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço, sendo as porcentagens de inibição 27,5%, 34% e 33%, respectivamente - Figura 2.

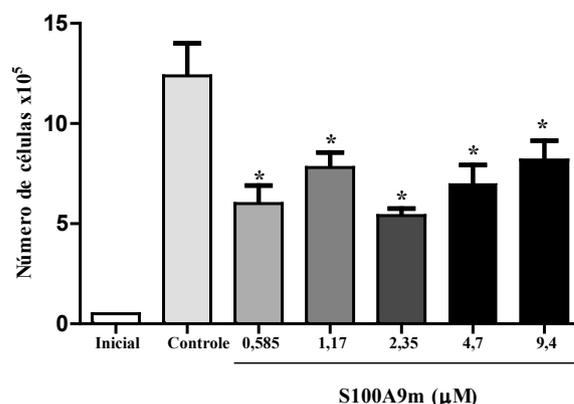


Figura 1 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço sobre a proliferação de 5x10<sup>4</sup> células endoteliais tímicas (tEnd.1). \*p<0,05 em relação ao grupo controle

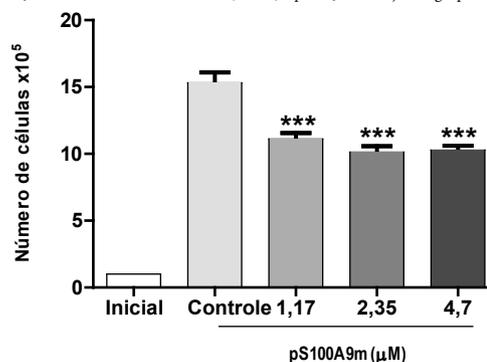


Figura 2 - Efeito do pS100A9m nas concentrações de 1,17; 2,35 ou 4,7µM/poço sobre a proliferação de 5x10<sup>4</sup> células de tumor de Walker 256 (LLC). \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle

**Ensaio de wound healing:** Com relação à migração das células endoteliais, conforme demonstrado na Figura 3A, foi observada uma ação inibitória do pS100A9m nas concentrações de 0,585µM/poço (25%); 1,17µM/poço (23%); 2,35µM/poço (37%); 4,7µM/poço (21%) ou 9,4µM/poço (28%), quando comparado com o controle. A concentração de 2,35µM/poço induziu efeito inibitório estatisticamente diferente das outras concentrações do pS100A9m avaliadas. As Figuras 3B, 3C e 3D são fotomicrografias representativas das culturas celulares utilizadas para avaliar a migração de células tEnd.1 pelo método do *wound healing*. A Figura 3B corresponde ao tempo 0, período em que a monocamada foi interrompida. A Figura 3C corresponde ao grupo controle, células incubadas apenas com meio de cultura, em que foi observada a migração das células endoteliais tímicas para o campo vazio 24 horas após a interrupção da monocamada. A Figura 3D representa o grupo tratado com o pS100A9m (2,35µM/poço) por 1 hora após a interrupção da monocamada. Após 24 horas deste procedimento, foi observada uma inibição da migração das células endoteliais para o campo vazio, em comparação com grupo controle (representado na figura 3C).

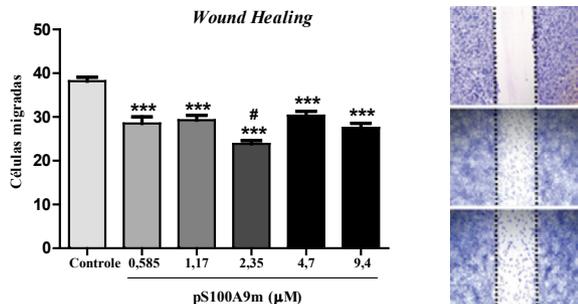


Figura 3 - Efeito do pS100A9m sobre a migração de células endoteliais tEnd.1 pelo modelo do wound healing. Figura 3A - O pS100A9m nas concentrações de 0,585; 1,17; 2,35; 4,7 ou 9,4µM/poço foi incubado com 1x10<sup>6</sup> células endoteliais tímicas (tEnd.1) e a avaliação das células migradas foi realizada 24h após a interrupção da monocamada celular. \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle. #p<0,05em relação às demais concentrações do pS100A9m. Figura 3B - fotomicrografia correspondente ao momento em que a monocamada foi interrompida. Figura 3C - fotomicrografia obtida de células endoteliais incubadas apenas com meio de cultura e migradas para o campo vazio 24h após a interrupção da monocamada. Figura 3D - fotomicrografia obtida 24h após a interrupção da monocamada referente ao grupo tratado com o pS100A9m (2,35µM/poço)

Ensaio de adesão: Todas as concentrações do peptídeo utilizadas (0,585; 1,17; 2,35; 4,7µM/poço) diminuíram a adesividade das células tEnd.1 à fibronectina e ao colágeno tipo I. Além disso, baseado nos resultados obtidos até o momento, para a adesão das tEnd.1 à laminina foi avaliada apenas a concentração de 2,35µM/poço do pS100A9m, o qual induziu uma inibição de 22% deste parâmetro em comparação com o grupo controle (dados não mostrados). Ensaio de formação de tubos: O pré-tratamento das células endoteliais tímicas com o pS100A9m, nas duas concentrações utilizadas, inibiu a formação de tubos observada em Matrigel quando comparado com o grupo controle, células tEnd.1 tratadas apenas com meio de cultura - Figura 4A. Este resultado também foi observado quando o peptídeo foi incubado concomitante às células tEnd.1 durante a formação de tubos em Matrigel - Figura 4B. As Figuras 4C e 4D são fotomicrografias representativas dos vasos formados em estrutura 3D. A Figura 4C representa o grupo controle, tratado apenas com meio de cultura, em que é observado um grande número de formações tubulares. Figura 4D representa o grupo em que as tEnd.1 foram pré-tratadas com o pS100A9m (2,35µM/poço), demonstrando uma redução das estruturas tubulares.

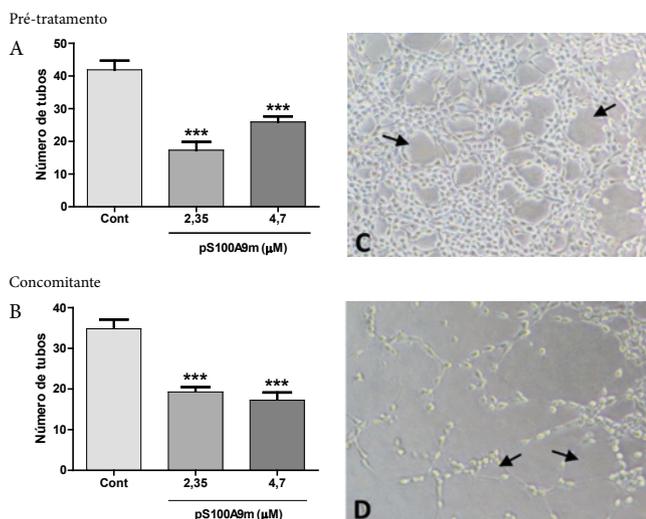


Figura 4 - Efeito do pS100A9m sobre a formação de tubos pelas células endoteliais tEnd.1. Figura 4A - 2,5x10<sup>4</sup> células endoteliais tímicas foram pré-tratadas com pS100A9m nas concentrações de 2,35 ou 4,7µM/poço por 1h. Em seguida, as tEnd.1 foram adicionadas ao Matrigel para o formação de tubos por um período de no máximo 6hs. Figura 4B - representam os dados obtidos quando o pS100A9m, nas mesmas concentrações, foi incubado concomitante as tEnd.1 durante todo o período de formação de tubos. \*\*\*p<0,001 em relação ao grupo controle. Figura 4C - fotomicrografia representativa das formações tubulares do grupo controle. Figura 4D - fotomicrografia obtida de vasos formados em estrutura 3D de células endoteliais tímicas pré-tratadas com 2,35µM/poço do pS100A9m. Indicam formações de tubos

**Conclusão:** Os resultados aqui apresentados, referentes aos estudos com as células endoteliais tímicas (tEnd.1), demonstraram que o pS100A9m inibe os eventos *in vitro* envolvidos na angiogênese, tais como proliferação, migração e adesão à componentes de matriz extracelular, bem como a formação de novos vasos em modelo 3D de Matrigel. Esses resultados sugerem que além de inibir as funções de células inflamatórias, o peptídeo do C-terminal da S100A9 murina tem a capacidade de modular a neovascularização, a qual é fundamental para o crescimento do tumor e metástase. Ainda, o estudo preliminar sobre o efeito do pS100A9m nas células tumorais da linhagem LLC Walker 256 mostrou uma inibição da proliferação celular, sugerindo que o peptídeo também é capaz de interferir com a progressão tumoral. Em conjunto, os dados obtidos até o momento evidenciam, pela primeira vez, que o pS100A9m é um importante instrumento para a compreensão e controle da fisiopatologia do processo tumoral. **Agradecimentos:** Ao apoio financeiro da FAPESP (Processos: 2012/51241-5 e 2013/01295-4) e CNPq (Processo: 830619/1999-2).

#### Referências

- Giorgi, R.; Pagano, R. L.; Dias, M. A.; Aguiar-Passeti, T.; Sorg, C.; Mariano, M., Antinociceptive effect of the calcium-binding protein MRP-14 and the role played by neutrophils on the control of inflammatory pain. *J Leukoc Biol*, 64: 214-20, 1998.
- Pagano, R. L.; Sampaio, S. C.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Giorgi, R., The C-terminus of murine S100A9 inhibits spreading and phagocytic activity of adherent peritoneal cells, *Inflammation Research*, 54: 204-210, 2005.
- Pagano, R. L.; Sampaio, S. C.; Juliano, L.; Juliano, M. A.; Giorgi, R., Involvement of proteinase-activated receptors 1 and 2 in spreading and phagocytosis by murine adherent peritoneal cells: Modulation by the C-terminus of S100A9 protein. *European J. of Pharmacology*, 628: 240-46, 2009.
- Weis, S. M. e Cheresh, D. A. av integrins in angiogenesis and câncer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi. 10.1101, 2011, revisão.
- Heinzmann, C. W.; Fritz, G.; Schäfer, B. W., S100 proteins: structure, functions and pathology, *Medline*, 7:d1356-68, 2002.
- Ghavami, S.; Rashedi, I.; Dattilo, B. M.; Eshraghi, M.; Chazin, W. J.; Hashemi, M.; Wesselborg, S.; Kerkhoff, C.; Los, M., S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 6: 1484-1492, 2008.

### PAPEL DA INSULINA NA VIGÊNCIA DO REMODELAMENTO DA ASMA EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E SADIOS FERREIRA, S.S.1; NUNES, F.P.B.1; MARTINS J.O.1

<sup>1</sup>Laboratório de Imunoendocrinologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo –SP, Brasil. Email: sabrinaserreira@usp.br

**Introdução:** A asma, doença inflamatória crônica das vias aéreas, envolve a participação de várias células, citocinas e mediadores inflamatórios em que a fase inicial é completamente diferente da fase tardia. Esta associada com linfócito Th2 e secreção de IgE [1,2,3]. *Diabetes mellitus* (DM) tipo 1 é considerada uma doença autoimune que resulta na destruição das células beta pancreáticas [4,5]. A asma e o diabetes são doenças comuns. Dados sugerem que a resposta imune é prejudicada em indivíduos diabéticos [6]. No entanto, existe uma correlação negativa entre asma e DM. A coexistência das duas patologias em um mesmo indivíduo é incomum, fato não esperado levando-se em conta a alta incidência das doenças isoladas na população geral [6,7].

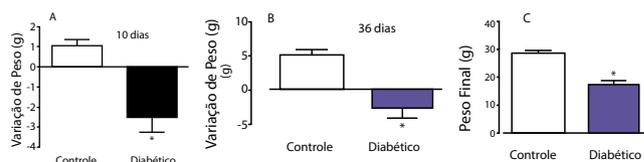
Aspectos diversos desta associação já foram descritos: o desencadeamento de DM, em pacientes previamente asmáticos, determina uma melhora do quadro asmático; o tratamento de paciente diabético com insulina agrava a asma; na maioria dos casos em que ocorre a associação, a gravidade das duas doenças é leve. Em suma, asma e diabetes parecem apresentar certo tipo de antagonismo [8,9]. Estudos, utilizando modelo de inflamação pulmonar na fase inicial, revelaram que a insulina modula a produção/liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de expressão de P e E-selectina, e também a migração de neutrófilos no pulmão durante a fase inicial da reação inflamatória alérgica [10]. Portanto o presente trabalho foi delineado para avaliar o papel da insulina na vigência da fase tardia da inflamação alérgica pulmonar em camundongos diabéticos e saudáveis. **Material e métodos:** Foram utilizados camundongos machos BALB/C (CEUA/FCF/340), (8-12 semanas). Para indução de DM os animais receberam injeção endovenosa de aloxana (50mg/kg), já os animais controle receberam a injeção de solução salina pela mesma via. Para indução de asma, os animais foram sensibilizados, dez dias após a injeção de aloxana ou salina com uma injeção intraperitoneal de ovalbumina (OVA) e hidróxido de alumínio (OVA 20 $\mu$ g + 2mg de Al(OH)<sub>3</sub>, volume final de 0,2 mL em PBS) e receberam uma dose reforço após 12 dias. A partir do 28º dia, os animais receberam desafios consecutivos durante sete dias. Inicialmente foi realizada uma cinética para avaliar em diferentes intervalos de tempo (1h, 2h, 3h, 6h, 8h e 12h) a redução da glicemia após o tratamento com a insulina NPH. A partir da cinética, o tratamento com insulina seguiu dois protocolos diferentes: 1) insulina (2 UI, s.c.) oito horas antes do experimento ou 2) insulina 12 horas (2 UI, s.c., as 19h) e uma hora (1 UI s.c., as 7h) antes de cada desafio. Após 24h do último desafio, ou seja, no 36º dia, foram realizadas: a) contagem total e diferencial de células no lavado broncoalveolar (LBA); b) contagem total e diferencial de células do sangue periférico, c) análise morfológica do parênquima pulmonar (H/E), d) análise da deposição em vias aéreas de colágeno, por Tricômico de Masson e, e) análise da deposição de muco no interior dos bronquíolos por periódico de Schiff (PAS). **Resultados:** No presente trabalho, os experimentos realizados com camundongos machos da linhagem BALB/C, foi observado que a administração endovenosa de aloxana (60mg/kg), após dez dias e 36 dias, exibiu características do estado insulínopênico: perda de peso corporal e concentrações plasmáticas elevadas de glicose (>300 mg/dL). No mesmo período, o grupo controle apresentou normoglicemia (100-170 mg/dL), bem como ganho de peso corporal (Figura1). Na contagem total e diferencial de LBA. O grupo OVA+OVA exibiu um aumento de números de leucócitos comparado ao grupo OVA+SAL. Os grupos OVA+OVA e OVA+OVA+INS<sub>1</sub> apresentaram cerca de 25% de eosinófilos. O grupo ALO+SAL apresentou uma diminuição de leucócitos quando comparado com o grupo OVA+SAL. O grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub> apresentou um aumento de número de leucócitos quando comparado ao grupo ALO+OVA. O grupo ALO+OVA+INS<sub>14</sub> apresentou cerca de 7% de eosinófilos presentes no LBA (Figura 2A). Já no leucograma, aparentemente o número total de células foi similar em todos os grupos, mas o grupo OVA+OVA apresentou aproximadamente 34% de eosinófilos e o grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub> apresentou cerca de 10% de eosinófilos sugerindo a migração desses eosinófilos para o tecido (Figura 2B). Na morfologia, com coloração de H/E os grupos OVA+SAL, ALO+SAL, ALO+OVA e ALO+OVA+INS<sub>1</sub> não exibiram inflamação ou anormalidades estruturais no pulmão. Já o grupo ALO+OVA+INS<sub>1</sub>, com uma única dose de insulina NPH, apresentou presença de leucócitos polimorfonucleares dentro dos vasos, corroborando com os resultados do leucograma, mostrando que as células tendem a migrar para o tecido. Os grupos ALO+OVA+INS<sub>14</sub>, exibiram leucócitos polimorfonucleares no tecido, corroborando com os resultados de LBA (Figura 3). Na deposição de colágeno, foi constatado que uma única dose de insulina não foi capaz de restaurar os níveis de deposição de colágeno. Já 14 doses consecutivas, foram capazes de restaurar essa deposição de colágeno ao redor das vias aéreas

(Figura4A). Na produção de muco também foi observado que uma única dose de insulina não foi capaz de restaurar a produção de muco, mas 14 doses consecutivas foram capazes de restaurar essa deposição de muco dentro das vias aéreas (Figura 4B).

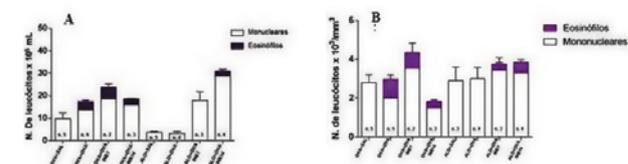
**Tabela 1** - Cinética da insulina em animais diabéticos e asmáticos

Animais	Glicemia Antes da insulina	Glicemia 1h depois da insulina	Glicemia 2h depois da insulina	Glicemia 3h depois da insulina	Glicemia 6h depois da insulina	Glicemia 8h depois da insulina
Diabético	500 $\pm$ 19	285 $\pm$ 38	372 $\pm$ 20	342 $\pm$ 95	501 $\pm$ 44	568 $\pm$ 15
Asmático	149 $\pm$ 11	68 $\pm$ 8	67 $\pm$ 2	62 $\pm$ 2	134 $\pm$ 13	153 $\pm$ 15

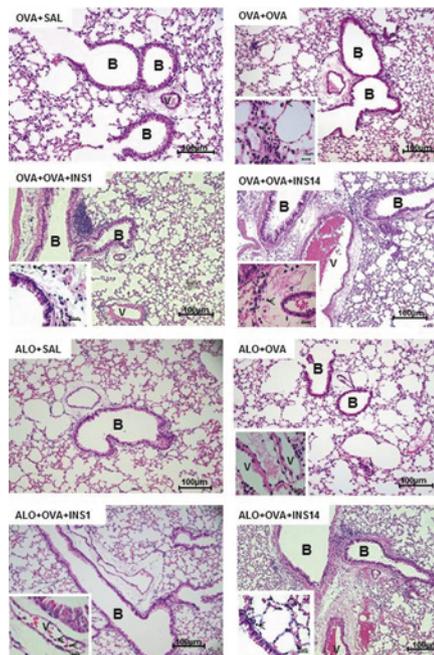
Os animais receberam tratamento com aloxana ou OVA, como descrito acima. Os animais diabéticos receberam 2UI de insulina NPH, e os animais asmáticos receberam 1UI de insulina NPH. Amostras de sangue foram obtidas por um corte na extremidade da cauda do animal, e a glicose determinada com um glicosímetro (Accu-Check Active – Roche Diagnosis®)



**Figura 1** - Determinação de variação de peso em 10 e 36 dias e peso final dos animais. A variação de peso dos animais, pertencentes ao grupo controle e animais diabéticos foi avaliada antes, 10 (Figura A) e 36 (Figura B) dias após a injeção endovenosa de aloxana ou salina (60mg/kg). Foi avaliada também o peso final dos animais pertencentes a cada grupo (Figura C) Os valores representam a média de peso  $\pm$  E.P.M. (5 animais por grupo). # p<0.05 estatisticamente diferente dos grupos controle

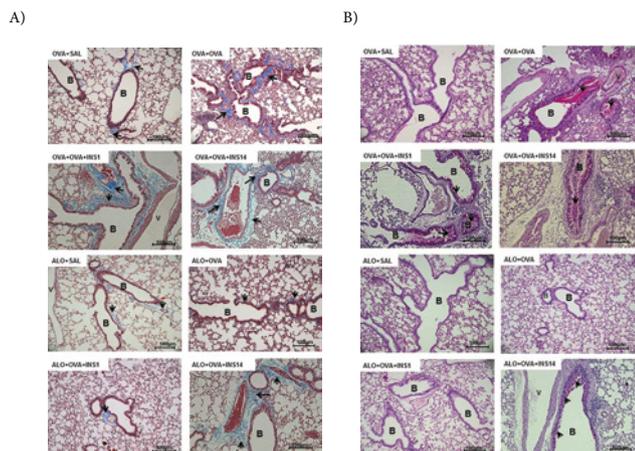


**Figura 2** - Contagem celular do LAB (Figura A) e contagem celular do sangue periférico (Figura B). Número de grupo de animais em cada torre do gráfico. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M



**Figura 3** - Parênquima pulmonar de camundongos. Fotomicrografia do parênquima pulmonar constituído por brônquios (B) e vasos (V). Notar OVA+SAL, ALO+SAL, ALO+OVA, apresentaram tecido preservado. OVA+OVA, OVA+OVA+INS<sub>1</sub>, OVA+OVA+INS<sub>14</sub>, e ALO+OVA+INS<sub>14</sub> apresentaram infiltrado inflamatório com presença de polimorfonucleares (seta). ALO+OVA+INS<sub>1</sub>, apresentou presença de infiltrado inflamatório com predominância de polimorfonucleares dentro dos

vasos. Já o grupo ALO+OVA+INS<sub>14</sub> apresentou a presença de polimorfonucleares ao redor das vias aéreas (seta). Aumento de 10x (H/E)



**Figura 4** - Parênquima pulmonar de camundongos, deposição de colágeno (direita), produção de muco (esquerda). Constituído de brônquios (B) e vasos (V). Notar colágeno ao redor das vias aéreas (seta) e notar a presença de muco dentro das vias aéreas. Aumento de 10x. Tricômico de Masson (Figura A). PAS (Figura B)

**Conclusão:** Os dados apresentados sugerem que a insulina modula a migração de eosinófilos no sangue periférico para o tecido pulmonar, bem como a deposição de colágeno e produção de muco durante a fase tardia da reação inflamatória alérgica. **Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Projeto Jovem Pesquisador (2010/02272-o) e FAPESP (2012/06617-7) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), CAPES e Pró-Reitoria da USP.

## References

- GALLI, S.J., TSAI, M., PILIPONSKY, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature*. 454, 2008.
- SCHOFIELD, M., & CALHOUN K.H. Immunology of asthma. *Otolaryngol Clin N Am*. 44:591-601, 2011.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMONIA E TISIOLOGIA. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia*. 2012.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*. São Paulo, SP. 2012-2013.
- van BELLE, T. L.; COPPIETERS, K. T.; von HERRATH, M. G. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiology Review*. V: 91, n. 1, p. 79-118, 2011.
- DOUEK, I. F.; LEECH, N. J.; GILLMOR, H. A.; BINGLEY, P. J.; GALE, E. A. M. Children with type-1 diabetes and their unaffected siblings have fewer symptoms of asthma. *The Lancet*. 353: 1850, 1999.
- HELANDER, E. Asthma and diabetes. *Acta Med. Scand.*. 162: 165-174, 1958.
- SINGH S, PRAKASH, Y.S, LINNEBERG, A. AGRAWAL, A. Insulin and the lung connecting asthma and metabolic syndrome. *Hindawi*. 2013.
- VIANNA, E. S. O. & GARCIA-LEME, J. Allergen-induced airway inflammation in rats. Role of insulin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*. 151: 809-814, 1995.
- MARTINS, J.O; CAMPOS C.A.L; CRUZ, J.W.M.C; MANZOLLI, S; ALVES, V.A.F; VIANNA, E.O; JANCAR, S; SANNOMIYA, P. Insulin modulates cytokine release and selectin expression in the early phase of allergic airway inflammation in diabetic rats. *BMC Pulmonary Medicine*, 10:39, 2010.

## A INFLUÊNCIA DA DESNUTRIÇÃO PROTEÍCA SOBRE A PRODUÇÃO DE GM-CSF E M-CSF POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

OLIVEIRA, DC.<sup>1</sup>; HASTREITER, AA.<sup>1</sup>; BORELLI, P.<sup>1</sup>; FOCK RA.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências farmacêuticas Universidade de São Paulo.

**Introdução e objetivos:** A hematopoese é o processo de formação e desenvolvimento de células sanguíneas. Esse processo está sob o controle de diversas citocinas e fatores de crescimento. Dentre esses fatores destaca-se o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) que são importantes para o desenvolvimento e formação de monócitos e macrófagos [1,2]. Os fatores M-CSF e GM-CSF fazem a mediação da sobrevivência, diferenciação, e modulação funcional de várias populações de células sanguíneas. Apesar de diferentes populações mielóides responderem a esses fatores, a linhagem celular de macrófagos é o alvo comum dos dois fatores [3,4]. M-CSF é detectável na circulação em estado basal, no entanto a produção de GM-CSF normalmente precisa de estímulo como, por exemplo, estímulos inflamatórios para ser facilmente mensurável *in vivo* [4,5]. Num estado de desnutrição proteica a resposta imune e a hematopoese estão comprometidas. O comprometimento da produção de células sanguíneas com redução de células progenitoras hematopoéticas, hipoplasia e alterações estruturais medulares em animais desnutridos, o que em parte contribui para a leucopenia periférica e neutropenia, comprometendo tanto a resposta imune inata quanto a resposta imune adaptativa, comumente encontrada nos estados de desnutrição proteica foi demonstrado [6,7]. Sabendo que a desnutrição proteica pode prejudicar a resposta imune e a hematopoese, e considerando a importância do M-CSF e GM-CSF nos dois processos, o presente trabalho foi delineado para pesquisar a influência da desnutrição proteica na produção de M-CSF e GM-CSF. **Materiais e métodos:** Foram utilizados camundongos BALB/c machos com dois meses de idade. Os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais (ciclo 12 horas claro/escuro, Temperatura de 22-25°C e 55% de umidade) e separados aleatoriamente entre grupo controle e grupo desnutrido. Os animais do grupo desnutrido receberam ração hipoproteica (n=12), com uma dieta contendo 2% de proteína, enquanto os camundongos controle (n=12) foram alimentados com uma dieta contendo 12% de proteína por cerca de quatro semanas. As rações continham 100 g/kg de sacarose, 80g/kg de óleo de milho, 10g/kg de fibra, 2,5g/kg de bitartrato de colina, 1,5g/kg de L- metionina, 40 g/kg de mistura de minerais e 10 g/kg de mistura vitamina. A ração controle continha 120g/kg de caseína e 636g/kg de amido de milho e a ração hipoproteica continha 20 g/kg de caseína e 736g/kg de amido de milho. Com exceção do teor de proteínas, as duas dietas eram idênticas e isocalóricas. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética da faculdade de Ciências Farmaceuticas da Universidade de São Paulo. Foram avaliados o consumo de ração, a variação de peso corpóreo, a quantificação de albumina e proteínas plasmáticas e o hemograma. As células da cavidade peritoneal foram coletadas, quantificadas e posteriormente foram utilizadas para a avaliação da expressão de RNAm de M-CSF e GM-CSF por PCR. Células cultivadas *in vitro* na concentração de 1x10<sup>6</sup> células/mL e estimuladas ou não com TNF-α (10ng/mL) por 2 horas foram utilizadas para quantificação da produção de M-CSF e GM-CSF no sobrenadante por ELISA. **Resultados:** Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, redução de células da cavidade peritoneal. A produção de M-CSF não apresentou diferença entre os grupos, no entanto células dos animais desnutridos apresentaram capacidade reduzida de produção de GM-CSF (TABELA1). Os resultados não mostraram diferença na expressão de RNAm do M-CSF, no entanto a expressão de GM-CSF estava reduzida nos animais do grupo desnutrido quando comparado com os

respectivos controles (Figura 1A e 1B). A produção de M-CSF dos animais do grupo controle e desnutridos não apresentaram diferenças na produção dessa citocina em células estimuladas ou não com TNF- $\alpha$  (Figura 2A). Os resultados mostraram que os animais do grupo desnutrido quando estimulados ou não com TNF- $\alpha$ , produzem menor quantidade de GM-CSF quando comparado com animais do grupo controle (Figura 2B).

**Tabela 1** - Variação do peso corpóreo, do consumo de ração e proteína, da concentração de proteína e albumina plasmática e do hemograma dos animais controle e dos animais desnutridos

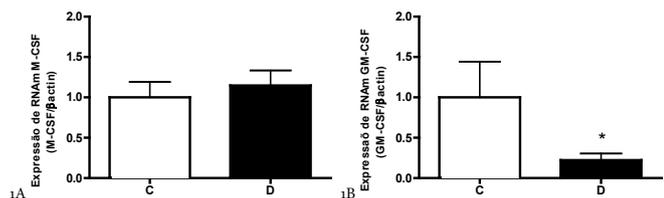
Variáveis	Controle (n=12)	Desnutrido (n=12)
Variação do peso corpóreo (%)	+20.49 $\pm$ 1.65	-18.59 $\pm$ 1.15***
Consumo de ração (g/dia/animal)	5.16 $\pm$ 0.20	4.98 $\pm$ 0.14
Consumo de proteína (g/dia/animal)	0.62 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.01***
Proteína plasmática (g/dL)	6.53 $\pm$ 0.30	5.24 $\pm$ 0.23**
Albumina (g/dL)	2.82 $\pm$ 0.14	1.88 $\pm$ 0.16**
Eritrócitos ( $\times 10^6/mm^3$ )	9.30 $\pm$ 0.31	7.46 $\pm$ 0.31**
Hematócrito (%)	41.6 $\pm$ 0.95	35.8 $\pm$ 1.12**
Hemoglobina (g/dL)	13.2 $\pm$ 0.52	11.0 $\pm$ 0.42**
Leucócitos periféricos (/mm <sup>3</sup> )	2833 $\pm$ 273.1	1283 $\pm$ 107.9***
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	563.8 $\pm$ 67.2	160.6 $\pm$ 16.7***
Eosinófilos (/mm <sup>3</sup> )	13.42 $\pm$ 7.26	2.33 $\pm$ 1.64
Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	2153 $\pm$ 216.8	1089 $\pm$ 99.5***
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	106.2 $\pm$ 17.78	31.9 $\pm$ 5.09**

\*\* (p  $\leq$  0.01) and \*\*\* (p  $\leq$  0.0001) indica diferença significativa entre os grupos controle e o grupo desnutrido

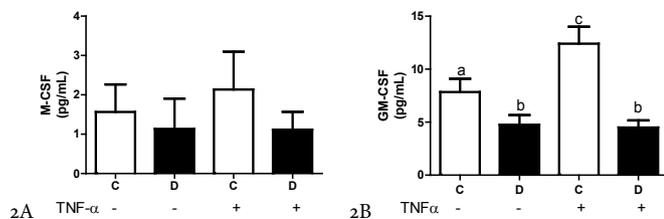
**Tabela 2** - Número total e dos diferentes tipos celulares no exudato peritoneal dos animais controle e animais desnutridos

Variáveis ( $\times 10^6/mL$ )	Controle (n=12)	Desnutrido (n=12)
Células peritoneais totais	2.42 $\pm$ 0.14	1.86 $\pm$ 0.16*
Células mononucleares totais	2.31 $\pm$ 0.13	1.77 $\pm$ 0.15*
Granulócitos peritoneais	0.08 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01
Mastócitos peritoneais	0.026 $\pm$ 0.006	0.026 $\pm$ 0.01

\* (p  $\leq$  0.05) indica diferença significativa entre os grupos controle e o grupo desnutrido



**Figura 1** - Expressão de RNAm de M-CSF e GM-CSF em células peritoneais. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão, animais do grupo controle (C) (n = 4) e grupo desnutridos (M) (n = 4). \* (p  $\leq$  0.05) indica diferença significativa entre os grupos controle e o grupo desnutrido



**Figura 2** - Os resultados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão dos níveis de M-CSF e GM-CSF no sobrenadante da cultura de células peritoneais sem estímulo ou com estímulo de TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) por 2 horas, animais do grupo controle (C) (n = 8) e desnutridos (M) (n=9). Letras diferentes sobre escritas indicam diferença significativa entre os grupos

**Conclusão:** No presente trabalho, foi demonstrada a existência de uma redução na produção de GM-CSF e na expressão do RNAm de GM-CSF em animais desnutridos. Este padrão de produção de citocinas pode ser um dos aspectos que explicam a imunodeficiência e alterações da hematopoese comumente encontradas em situação de desnutrição protéica.

**Agradecimentos:** Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

## Referências

METCALF, D. Concise review: hematopoietic stem cells and tissue stem cells: current concepts and unanswered questions. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, v. 25, n. 10, p. 2390–2395, 2007.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 505, n. 7483, p. 327–334, 2014.

HAMILTON, J. A.; ACHUTHAN, A. Colony stimulating factors and myeloid cell biology in health and disease. *Trends in Immunology*, v. 34, n. 2, p. 81–89, 2013.

HAMILTON, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 7, p. 533–544, 2008.

SIERRA-FILARDI, E.; NIETO, C.; DOMINGUEZ-SOTO, A.; et al. CCL2 Shapes Macrophage Polarization by GM-CSF and M-CSF: Identification of CCL2/CCR2-Dependent Gene Expression Profile. *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 8, p. 3858–3867, 2014.

BORELLI, P.; BARROS, F. E. V.; NAKAJIMA, K.; et al. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et al.]*, v. 42, n. 6, p. 523–530, 2009.

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A. R.; et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histology and Histopathology*, v. 22, n. 6, p. 651–660, 2007.

# Normas para publicação

- As colaborações enviadas à **Revista de Educação Continuada em Veterinária e Zootecnia** na forma de artigos, pesquisas, nota prévia, comentários, atualizações bibliográficas, relatos de casos, notícias e informações de interesse para a classe médica veterinária e de zootécnicos devem ser elaboradas utilizando softwares padrão IBM/PC (textos em Word for DOS ou Winword, até versão 2007; gráficos em Winword até versão 2007, Power Point ou Excel 2007) ou Page Maker 7, ilustrações em CorelDraw até versão X3 (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou Photoshop até versão CS4.
- **Revisão:** Os artigos de revisão tem estrutura livre, de acordo com os objetivos do(s) autor(es) e da Revista, o artigo de Revisão deve apresentar avaliações críticas sistematizadas da literatura sobre determinado assunto. De preferência, a estrutura deve contemplar o resumo, a introdução e os objetivos, as fontes consultadas, os critérios adotados, a síntese dos dados, conclusões e comentários.
- **Artigo técnico:** Contribuição destinada a divulgar o estado da arte e da ciência em assuntos técnico-científicos que envolvem a Medicina Veterinária e Zootecnia. Trata-se de abordagem contemplando informações com o objetivo de educação continuada, uma vez que contribuições científicas com resultados de pesquisas originais devem ser publicadas em revistas especializadas e com corpo e perfil editorial específico. A estrutura é livre, devendo conter o resumo, a introdução, os objetivos do artigo e referências.
- **Relato de caso:** Serão aceitos para publicação os relatos que atenderem os objetivos da educação continuada nas áreas da Medicina Veterinária e da Zootecnia. Estrutura: Introdução, Descrição do Caso, Discussão e Conclusões, Referências.
- **Ensaio:** Estudos teóricos de determinados temas apresentados sob enfoque próprio do(s) autor(es).
- Com a finalidade de tornar mais ágil o processo de diagramação da Revista, solicitamos aos colaboradores que digitem seus trabalhos em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas. O tipo da fonte pode ser Times New Roman, ou similar, no tamanho 12.
- Os gráficos, figuras e ilustrações devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente nove páginas em fonte Times New Roman 12, com espaço duplo e margens 2,5 cm). No caso dos artigos de revisão, em casos excepcionais, o tamanho total do trabalho poderá ser superior a nove páginas.
- Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e coautores, nome completo das instituições às quais pertencem, summary, resumo e palavras-chave.
- As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520, sistema autor-data.
- Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).
- O primeiro autor deverá fornecer o seu endereço completo (rua, no, CEP, cidade, Estado, país, telefone, fax e e-mail), o qual será o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.
- Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente on-line para revista@crmvsp.gov.br.
- Recebido o trabalho pela Redação, será enviada declaração de recebimento ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis. Caso isso não ocorra, deve-se entrar em contato com a Assessoria de Comunicação do CRMV-SP pelo telefone (11) 5908-4772.
- Arquivos que excederem a 1 MB deverão ser enviados zipados (WinZip ou WinRAR).
- Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados.
- As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.
- As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.
- Não serão remetidos trabalhos via fax.
- As matérias enviadas para publicação não serão retribuídas financeiramente aos autores, os quais continuarão de posse dos direitos autorais referentes às mesmas. Parte ou resumo das matérias publicadas nesta revista enviadas a outros periódicos deverão assinalar obrigatoriamente a fonte original.
- Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à redação pelo e-mail revista@crmvsp.gov.br.



## Dúvidas

revista@crmvsp.gov.br

# Médico Veterinário ou Zootecnista: na Qualicorp você tem excelentes opções para cuidar da saúde, pelo melhor preço.<sup>1</sup>

**SulAmérica**  
Saúde

**Amil**

**Unimed**   
Paulistana

Planos de saúde coletivos por adesão são aqueles disponibilizados para pessoas de uma mesma categoria profissional ou área de atuação, por meio de sua entidade de classe. É o seu caso, Médico Veterinário ou Zootecnista associado ao CRMV-SP. A Qualicorp é líder nesse mercado e trabalha para você ter cada vez mais acesso à saúde de qualidade. Confira.



As mais conceituadas operadoras de saúde do Brasil.



Inúmeras opções de planos com os melhores médicos, hospitais e laboratórios.<sup>2</sup>



Além do CRMV-SP, somos parceiros de centenas de entidades, o que nos dá legitimidade para negociar preços mais baixos.

Antes de escolher seu plano, converse com a Qualicorp.

Ligue: **0800 799 3003**

De segunda a sexta-feira, das 9h às 21h; aos sábados, das 10h às 16h.

ou acesse: [www.economizemaqualicorp.com.br](http://www.economizemaqualicorp.com.br)

