

EXAMES COMPLEMENTARES

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MENSURAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE INTERLEUCINA-31 CUTÂNEA EM CÃES

MACHADO, L.H.A.¹; TADEU, A.D.¹; ALVES, C.E.F.¹; BARBOSA, L.C.¹; BIANCARDI, C.M.¹; ZAHN, F.S.¹

1- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
E-mail: henrique@fmvz.unesp.br

Cães com Dermatite Atópica (DA) apresentam o prurido como sinal clínico mais significativo, causando um efeito negativo na qualidade de vida do animal. Os mecanismos que causam o prurido ainda não foram totalmente elucidados, o que dificulta o desenvolvimento de novas terapias. Dentre os mecanismos imunológicos envolvidos, acredita-se que a interleucina 31 (IL-31) apresente papel fundamental. A IL-31 é uma citocina envolvida em doenças cutâneas, dentre elas a DA. A expressão da IL-31 é considerada maior em lesões pruriginosas em comparação às não pruriginosas. O presente trabalho padronizou a técnica de imunistoquímica (IHQ) da interleucina 31 na pele de cães saudáveis, já que o anticorpo comercializado no Brasil ainda não possui padronização, para uma posterior mensuração de tal técnica na pele de cães atópicos. Foram coletadas 23 amostras de pele de cães saudáveis, previamente atendidos no HV da FMVZ-UNESP - Botucatu. As amostras foram obtidas por técnica de *punch* de duas regiões distintas (axilar e cervical dorsal), identificadas, imersas em meio de inclusão de espécies em congelamento e conservadas em freezer a -80°C. Os cortes histológicos foram realizados em criostato e dispostos em lâminas carregadas positivamente. As lâminas foram examinadas por microscopia óptica com a coloração de Hematoxilina e Eosina, e quando houve quantidade suficiente de epiderme para avaliação dos queratinócitos, pela técnica de IHQ, o material foi incluído no experimento. Para a técnica de IHQ foi utilizada a técnica padronizada no Laboratório de IHQ da Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP, com algumas modificações e o anticorpo anti-IL31, diluído na proporção 1:100. O primeiro teste revelou marcação positiva em células inflamatórias da epiderme, estromais e alguns folículos pilosos. Parte da marcação foi considerada inespecífica e o protocolo foi adaptado para a minimização deste efeito. O novo protocolo apresentou resultados positivos, com marcações adequadas de IL-31. A técnica mostrou-se adequada para mensuração da proteína, possibilitando continuidade nos estudos para a avaliação de possíveis terapias para doenças de pele pruriginosas com envolvimento da IL-31.

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE MENSURAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA FILAGRINA CUTÂNEA DE CÃES

MACHADO, L.H.A.¹; BIANCARDI, C.M.¹; ALVES, C.E.F.¹; BARBOSA, L.C.¹; TADEU, A.D.¹; ZAHN, F.S.¹

1- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)
E-mail: henrique@fmvz.unesp.br

A Filagrina é uma proteína responsável pela queratinização adequada da pele. Os filamentos de queratina são unidos por ligações cruzadas de filagrina, que os agregam em feixes compactos e levam ao achatamento celular característica marcante dos queratinócitos. Sua principal função é a estruturação dos queratinócito. Mutações levam a uma barreira de pele perturbada e presença de xerose, características marcantes na dermatite atópica. O presente trabalho padronizou a técnica de imunistoquímica (IHQ) da filagrina na pele de cães saudáveis, para a sua posterior mensuração na pele de cães atópicos. Foram coletadas 23 amostras de pele de cães saudáveis, atendidos no HV da FMVZ-UNESP -Botucatu. As amostras foram obtidas pela técnica de *punch* de 6 mm das regiões axilar e cervical dorsal, identificadas, imersas em meio de inclusão de espécies em congelamento e conservados em freezer -80°C. Os cortes histológicos foram realizados em criostato com 8 micrometros de espessura e dispostos em lâminas carregadas com carga positiva. Todas as amostras do experimento foram coletadas e a coloração de Hematoxilina e Eosina foi realizada para avaliação dos fragmentos. As lâminas foram avaliadas pelo Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ, por microscopia óptica. Para a técnica de IHQ foi utilizada a técnica padronizada no Laboratório de IHQ do Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ- UNESP, com algumas modificações e utilizando-se o anticorpo anti-filagrina, diluído na proporção 1:25. O protocolo apresentou resultados positivos, com marcações adequadas de filagrina e sem marcações inespecíficas. Foram realizados controles negativos para garantir a especificidade de marcação. Assim, em etapas posteriores, foi realizado um novo protocolo com adaptações no anticorpo secundário e foram incluídos os controles negativos da reação. A técnica mostrou-se adequada para mensuração da proteína, possibilitando continuidade nos estudos para a avaliação de possíveis terapias para doenças de pele pruriginosas.

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS INSTRUMENTOS PARA REALIZAÇÃO DE PRICK TESTS EM GATOS

CUNHA, V.E.S.¹; SOUZA, C.P.²

1- FDA Allergenic Ltda, Rio de Janeiro, Brasil

2- University of Minnesota – Veterinary Medical Center, Saint Paul MN, USA

E-mail: victor@fda-allergenic.com.br

Testes cutâneos são utilizados há décadas por médicos e veterinários para diagnóstico específico das alergias. Recentemente, Rossi e colaboradores realizaram um estudo piloto para comparar as respostas cutâneas em gatos saudáveis ao fosfato de histamina, empregando o teste intradérmico (TID) e o *prick test* (PT). Os autores observaram que as respostas obtidas por PT foram mais consistentes e mais fáceis de se interpretar que as obtidas por TID. O presente trabalho comparou dois instrumentos utilizados para PT em gatos. Foram testados, com o PT, dez gatos saudáveis (LQEPV/UFRRJ), com idades entre um e dez anos, de ambos os sexos e sem raça definida. Para sedação foi utilizada a Dexmedetomidina (Precedex) na dose de 20µg/kg IM. Nenhum dos gatos estava sob efeito de drogas capazes de interferir na reatividade cutânea. Foram utilizados dois instrumentos para PT: ALK Lancet (ALK Abelló) e Duotip-Test II (Lincoln Diagnostics). Como controle positivo, foi utilizado cloridrato de histamina (10mg/mL de histamina base) e como controle negativo, a solução salina contendo 0,45% de fenol (FDA Allergenic). Os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes, em duplicata no hemitórax esquerdo, após tricotomia com lâmina n° 50. A média dos diâmetros das reações e o coeficiente de variação médio das pápulas obtidas com os dois instrumentos foram 5,2 mm e 6,3% para ALK Lancet, e 6,1 mm e 7,9% para Duotip-Test II, respectivamente. Não foi observado o aparecimento de pápulas com os controles negativos. Rossi e colaboradores compararam dois instrumentos para PT, dentre eles o Duotip-Test II, considerado pelos autores como o mais apropriado para testar gatos. Os resultados do presente estudo demonstraram que, apesar do diâmetro médio obtido com o Duotip-Test II ter sido maior, as reações obtidas com a ALK Lancet foram mais reproduzíveis, o que foi evidenciado pelo menor coeficiente de variação médio. A conclusão obtida foi que os dois instrumentos testados podem ser utilizados para PT em gatos, induzindo respostas cutâneas mensuráveis e consistentes.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO GRANULOMA LEPROIDE CANINO, A PARTIR DE CORTES HISTOLÓGICOS EMBLOCADOS EM PARAFINA, PELA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) – ESTUDO RETROSPECTIVO (2002-2009)

MARUYAMA, S.^{1*}; BRANDÃO, P.E.²; CASTRO, A.M.³; MICHALANY, N.S.⁴; FYFE, J.³; MALIK, R.⁴; LARSSON, C.E.⁴

1- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, FMVZ/USP, São Paulo, SP

2- Laboratório Paulista de Dermatopatologia, São Paulo, SP
3- Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, North Melbourne, Victoria, Australia

4- Centre for Veterinary Education, University of Sydney, Sydney, Australia
E-mail: simonivet@gmail.com

O Granuloma leproide canino (GLC) ou “lepra canina” é uma micobacteriose, com quadro dermatopático que conta com aspectos ainda obscuros, principalmente quanto ao seu modo de transmissão e ao agente etiológico envolvido. Com a finalidade de verificar a caracterização gênica da micobactéria em questão, o presente trabalho foi executado a partir de cortes histológicos, de animais com diagnóstico estabelecido da enfermidade. A amostragem foi composta por 13 cães, atendidos no Serviço de Dermatologia do HOVET/USP. Tal material foi posteriormente submetido a duas modalidades de técnicas de reação em cadeia de polimerase (PCR): “nested” e em tempo real. O método da PCR “nested” confirmou a presença do agente em 23% dos animais e a PCR em tempo real em 69,2%. Pôde-se concluir ainda que a espécie de micobactéria causadora do Granuloma leproide canino nos cães brasileiros apresentou homologia gênica de 100%, quando comparada aos resultados de exames de animais de outros países.