

Revista Agrária Acadêmica

Agrarian Academic Journal

Volume 2 – Número 2 – Mar/Abr (2019)

doi: 10.32406/v2n22019/37-44/agrariacad

Padronização da técnica de imuno-histoquímica e investigação de componentes desencadeadores da contratura articular em ovinos. Standardization of immunohistochemical technique and investigation of components related to joint contracture in sheep

Jomel Francisco dos Santos^{1*}, Matheus Castro Franco², Marcio de Barros Bandarra³, Arivonaldo Vaniel da Silva⁴, Thiago Arcoverde Maciel⁵, Daniela Oliveira⁶

^{1*} - Docente do Curso de Medicina Veterinária, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM – Manaus/Amazonas – Brasil. jomel.santos@ifam.edu.br

² - Médico Veterinário/Campus de Ciências Agrárias e Engenharias/UFES/CCAUE/Universidade Federal do Espírito Santo – Alegre/Espírito Santo – Brasil. matheusr2@yahoo.com.br

³ - Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia./UFU. Uberlândia/Minas Gerais – Brasil. mbandarra@yahoo.com.br

⁴ - Discente do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. UAG/UFRPE. Garanhuns/Pernambuco – Brasil. arivonaldo_vaniel@hotmail.com

⁵ - Docente do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande, Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária, UFCG/UAMV. Campina Grande/Paraíba – Brasil. arcoverde.thiago@hotmail.com

⁶ - Docente do Curso de Medicina Veterinária, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. UAG/UFRPE. Garanhuns/Pernambuco – Brasil. danisjc6@yahoo.com.br

Resumo

Este estudo objetivou investigar a presença de componentes-chave, mastócitos e miofibroblastos, para desenvolvimento da contratura articular em ovinos e avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo deste problema. Foram utilizadas 15 cápsulas articulares de joelhos de ovelhas Santa Inês sadias para localização da proteína α -SMA, identificando a presença de miofibroblastos pela técnica de imuno-histoquímica, e mastócitos, pela coloração de Azul de Toluidina, em microscópio de luz. Os controles positivos foram corados satisfatoriamente pelas respectivas técnicas então padronizadas. Nas cápsulas articulares, raros mastócitos foram corados. Estudos sobre lesões de cápsula articular de ovinos devem ser conduzidos para confirmar a presença de miofibroblastos e desenvolvimento da contratura articular.

Palavras-chave: Cápsula articular. Eixo Fibrose. Ovinos. α -SMA. Mastócitos.

Abstract

This study aimed to investigate the presence of components, mast cells and myofibroblasts, to develop joint contraction in sheep and evaluate a potential as an experimental model for the development of this problem. Fifteen capsules of Santa Inês ewe lambs were used to localize the α -SMA protein, identifying a presence of myofibroblasts by the immunohistochemical technique, and mast cells by the Toluidine Blue staining under a light microscope. In the joint capsules, rare mast cells were stained. Studies on joint capsule lesions of sheep should be conducted to confirm the presence of myofibroblasts and joint contracture development.

Key-words: Joint capsule. Fibrosis axis. Sheep. α -SMA. Mast cells.

Introdução

As contraturas articulares ou perda de movimentos são complicações severas de doenças articulares que podem limitar permanentemente a função de extremidades (MORREY et al., 1981). A cápsula articular é a estrutura crítica que limita o movimento. Os tratamentos atuais para contratura em seres humanos têm pouca eficácia e há uma evidente necessidade de esclarecimento sobre a patofisiologia dessa disfunção crônica e incapacitante (TIMMERMAN et al., 1994; COHEN; HASTING, 1998).

Pesquisas já foram feitas na tentativa de descobrir o mecanismo de desenvolvimento da contratura articular e Hildebrand et al. (2004a,b, 2005, 2007, 2008b) propuseram um eixo de formação da fibrose que explica esse mecanismo. Desses estudos esses conseguiram determinar um eixo fibrótico que leva ao estabelecimento da contratura articular e seus componentes são os miofibroblastos, mastócitos e neuropeptídeos. Também mostraram que os números desses componentes estão aumentados na cápsula articular de pacientes com contratura pós-traumática.

As articulações do ovino são modelos promissores para a investigação dos estados normais e patológicos, pela semelhança com a mecanobiologia de determinadas articulações humanas e pela susceptibilidade a doenças articulares (DAWSON, 1987; APPLEYARD et al., 1999; HOLY et al., 2000; CALLADO et al., 2001; TAPPER et al., 2006; SPADARI et al., 2013).

Assim, investigações sobre contratura articular em animais, especialmente os ovinos, poderão levar ao aumento de diagnóstico e à melhoria do conhecimento do mecanismo deste problema, contribuindo igualmente para a saúde humana e animal. Portanto, foram padronizadas as técnicas de identificação de miofibroblastos e mastócitos para investigar a presença desses componentes-chave para o desenvolvimento da contratura articular no joelho ovino, a fim de se avaliar a potencialidade desta espécie como modelo experimental para estudo desta patologia.

Material e métodos

Esta pesquisa está em acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), registrado sob número 016037/2012-34.

Animais

Foram utilizados 15 ovinos da raça Santa Inês, fêmeas, adultas, sadias, obtidas em Abatedouro Municipal da região de Garanhuns, PE. A região Nordeste em 2013, segundo a Organização das Nações Unidas, teve a pior seca dos últimos 50 anos, o que levou à escassez de alimento nos 1.400 municípios atingidos (ONU, 2013), inclusive na região de Garanhuns. Com isso, houve um aumento do abate de fêmeas, justificando a maior oferta deste gênero para as coletas de cápsula articular neste experimento. Os animais foram avaliados quanto à higiene das articulações e somente os que não apresentaram sinais de doença articular ao exame físico foram incluídos no estudo. Após o abate do animal, foram coletadas as cápsulas da articulação do joelho, nas regiões mediais e laterais ao ligamento patelar.

Imuno-histoquímica

Fragmentos da cápsula articular do joelho de cada animal foram coletados e imersos em solução de formol tamponado a 10% por 24 horas, para posteriormente serem processados na rotina histológica em aparelho histotécnico (LupeTec, São Carlos, SP). Os blocos de parafina contendo os fragmentos de cápsula articular foram cortados em micrótomo manual (Leica, São Paulo, SP) com espessura de 5 μ m, utilizando lâminas polarizadas (Imunoslide, Rio de Janeiro, RJ).

As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinadas em estufa a aproximadamente 60°C por no mínimo uma hora, diafanizadas em dois banhos com xilol e reidratadas em concentrações decrescentes de álcool para então iniciar as colorações imuno-histoquímica e citoquímica pelo Azul de Toluidina. Em todas as reações foram adicionados um controle positivo e um negativo.

Dentre as etapas da técnica imuno-histoquímica a recuperação antigênica foi realizada pelo calor imergindo as lâminas em citrato de sódio 10 mM e pH 6,0 em banho-maria a 95°C, com subsequente resfriamento a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, realizou-se o bloqueio (Envision, Dako, São Paulo, SP) das peroxidases endógenas por 20 minutos, após delimitação dos cortes com caneta hidrofóbica (DakoPen, Dako, São Paulo, SP). As proteínas inespecíficas foram bloqueadas (Protein Block, Dako, São Paulo, SP) por 20 minutos. O anticorpo primário (Monoclonal anti α -SMA antibody produced in mouse, Sigma, São Paulo, SP) foi adicionado na diluição de 1:100 por duas horas em temperatura ambiente aproximadamente 27°C, ou *overnight* (18 horas) a 4°C. Em seguida, o anticorpo secundário (Anti-Mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in rabbit, Sigma, São Paulo, SP) foi aplicado às secções em temperatura ambiente por 60 minutos. O substrato Diaminobenzidina (DAB)/peróxido foi aplicado às secções por 10 minutos conforme recomendações do fabricante. A água destilada foi utilizada em todos os processos, realizando duas lavagens rápidas com água destilada e uma com Tris HCl pH 7,4 ou Tris EDTA pH 9,0. As lâminas foram rapidamente contracoradas com Hematoxilina de Harris por 30 segundos, e, após 10 minutos em água corrente, passaram pelo processo de reidratação e diafanização em bateria de concentrações crescentes de álcool e xilol, respectivamente, e após foram montadas com lamínula e Entellan (Merck, Damstadt, Germany) para serem avaliadas em microscópio de luz.

O controle positivo para a α -SMA utilizado foram cortes histológicos de cérvice ovina (Figura 1A), e o controle negativo, as mesmas lâminas de cápsula articular, porém, sem o anticorpo primário (Figura 1B).

Para a evidenciação dos mastócitos foi realizada a coloração de Azul de Toluidina (TOLOSA et al., 2003), específico para células metacromáticas, como o mastócito. A técnica consiste em, após a diafanização e desidratação, imergir as lâminas em solução a 0,1% de Azul de Toluidina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ) em água destilada, por 30 minutos. Como controle positivo foram utilizados cortes histológicos de cordão umbilical bovino.

As imagens dos cortes foram capturadas em aumentos de 50, 100 e 400 vezes para cada amostra com câmera digital (Leica, Recife, PE) acoplada ao microscópio de luz.

Resultados e discussão

A rotina de imuno-histoquímica foi realizada com variações até se obter a padronização da técnica. No início do processo de padronização, utilizaram-se lâminas histológicas comuns, sem adição de produto fixante. Foi observado que os cortes de cápsula articular nestas lâminas, quando submetidos

à rotina imuno-histoquímica, não mantiveram a integridade do tecido. Com isso, testou-se a utilização de lâminas tratadas com poli-lisina (Poly-L-lisine - Sigma Chemical Co, USA), onde uma parte das lâminas foi adicionada solução de 10% de poli-lisina em água destilada, e outras foram adicionadas 100% de poli-lisina. Apesar da recomendação do uso de lâminas tratadas com poli-lisina em rotina imuno-histoquímica (VOLPATO et al., 2012), no presente experimento essa substância não favoreceu a permanência e a qualidade do tecido estudado. Assim, optou-se pela utilização de lâminas polarizadas, que proporcionou maior aderência do tecido, ainda que não garantisse a integridade deste em todas as lâminas preparadas com a técnica de imuno-histoquímica.

Observou-se que a completa desparafinização dos cortes para iniciar a preparação histológica foi fundamental para o reconhecimento específico da α -SMA pelo anticorpo primário.

Não foi observada diferença na utilização das soluções de Tris HCl ou Tris EDTA para lavagem das lâminas.

A realização da recuperação antigênica pelo calor pode ter contribuído para a perda da integridade do tecido de algumas lâminas (Figura 2). Utilizaram-se três métodos diferentes para esta etapa: por meio de banho-maria, micro-ondas em potência máxima por 15 minutos, e panela de pressão comum (20 segundos após atingir a pressão). O banho-maria mostrou-se como o método mais prático para uso em qualquer laboratório de pesquisa.

O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com o uso de um bloqueador específico do kit comercial Envision utilizado por 20 minutos. Também se utilizou solução de metanol e peróxido de hidrogênio a 8% durante o processo de padronização da técnica. Notou-se que, por apenas acrescentar gotas ao corte histológico e não lavar a lâmina como na solução de metanol e peróxido de hidrogênio, o uso do bloqueador do kit preservou melhor a integridade do tecido.

O bloqueio das proteínas inespecíficas foi feito em câmara úmida na temperatura ambiente ou em estufa seca a 40°C. Como não houve diferença entre as técnicas, optou-se pela padronização em temperatura ambiente.

Para a preparação da solução de anticorpo primário a ser utilizado, este foi diluído em Tris HCl pH 7,4 com concentração de 1:100 e também foram feitos testes com concentrações de 1:50 (anticorpo:diluyente). Também se utilizou diluição em TRIS EDTA pH 9,0 ou solução de PBS autoclavado, ambas em concentração de 1:100. Não houve diferença entre as soluções utilizadas e, pela praticidade e pelo custo, optou-se pelo Tris HCl pH 7,4. A concentração de 1:100 foi mais adequada para evidenciar as estruturas que contém a α -SMA na cápsula articular de ovelhas (artérias e miofibroblastos) e está em acordo com o utilizado para também identificar miofibroblastos por Monument et al. (2010) em cápsula articular de coelhos e Volpato et al. (2012), estudando piometra em cadelas. Já autores como Lima et al. (2011), em pesquisa sobre endométrio de vacas, e Zuccari et al (2011) ao investigarem tumores de mama em cadela, utilizaram satisfatoriamente a concentração de anticorpo primário de 1:50.

Notou-se que o anticorpo secundário monoclonal α -SMA alcalino fosfatase produzido em camundongo (Sigma, São Paulo, SP) era incompatível com o anticorpo primário. Logo, substituiu-se este pelo anticorpo monoclonal SMA sem fosfatase, com preparação para o DAB, quando obteve-se êxito na marcação da proteína.

Não houve diferença quanto ao método de incubação do anticorpo por duas horas em câmara úmida em temperatura ambiente ou *overnight* (18 horas) a 4°C, assim como Hübner et al. (2005) observaram.

A Hematoxilina de Harris é um corante amplamente utilizado na contracoloração imuno-histoquímica (HÜBNER et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006; LIMA et al., 2011; VOLPATO et al.,

2012), por marcar os núcleos de todas as células do tecido avaliado, delimitando a identificação imuno-histoquímica, possibilitando a análise histomorfométrica.

A coloração de Azul de Toluidina foi adequada para localização dos mastócitos e já é uma técnica consagrada para tal (TOLOSA et al., 2003). A técnica de imuno-histoquímica oferece maior precisão para marcar proteínas específicas (marcadores), como a triptase ou a quimase, para a identificação dos mastócitos, tal como Monument et al. (2010) utilizaram. Comparando ambas as técnicas, o Azul de Toluidina oferece vantagem porque alia especificidade e baixo custo, ainda que não tenha a precisão da imuno-histoquímica.

Cápsulas articulares saudáveis possuem baixo número de mastócitos (HILDEBRAND et al., 2008b), assim como constatado nesse estudo. Raros campos observados continham um mastócito e, em determinados cortes nenhum exemplar foi visibilizado. Em cápsulas lesionadas esse número pode variar, assim como relatado por Monument et al. (2010), que observaram um aumento no número de mastócitos em cápsulas com contratura pós-traumática.

Devido ao baixo número dos tipos celulares estudados, não se avaliou histomorfometricamente miofibroblastos ou mastócitos.

Reações inespecíficas aconteceram na marcação imuno-histoquímica (Figura 3) na região em que poderiam ser localizados os miofibroblastos. Como as artérias (músculo liso) da cápsula e o controle positivo (cérvice) foram satisfatoriamente marcados (Figuras 1 e 2), então outros estudos deverão ser conduzidos para a confirmação da presença do miofibroblasto em cápsulas articulares. Hildebrand et al. (2004) e Abdel et al. (2012) observaram um aumento de quatro a cinco vezes no número de miofibroblastos em cápsulas articulares que apresentaram contratura pós-traumática. Portanto, estudos posteriores que avaliem cápsulas articulares lesionadas de ovinos poderão confirmar a presença desse tipo celular nesse tecido.

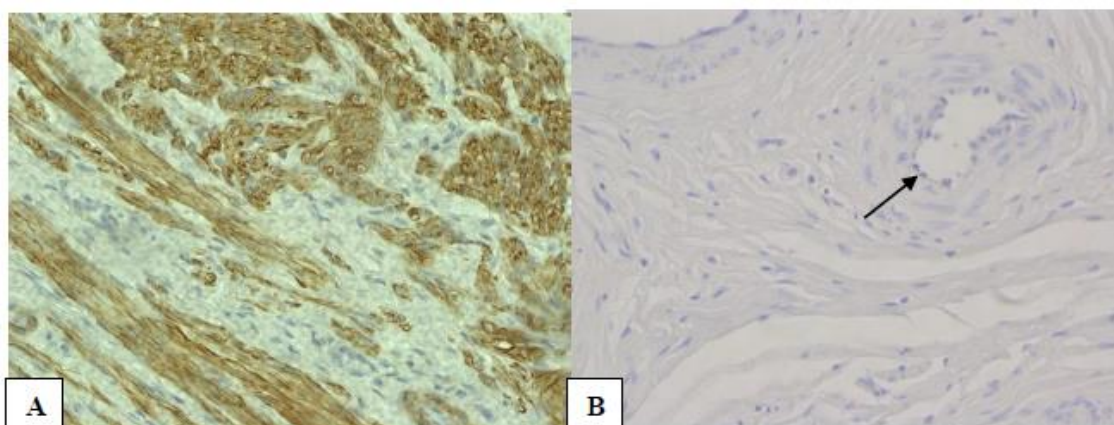


Figura 1 – Fotomicrografia dos controles positivo (A) e negativo (B) da técnica de imuno-histoquímica. Em A nota-se fibras musculares longitudinais e transversais marcadas na cervice ovina e em B observa-se apenas os núcleos marcados com a contracoloração de Hematoxilina de Harris, inclusive na região de uma artéria (seta). A e B, aumento de 400x.

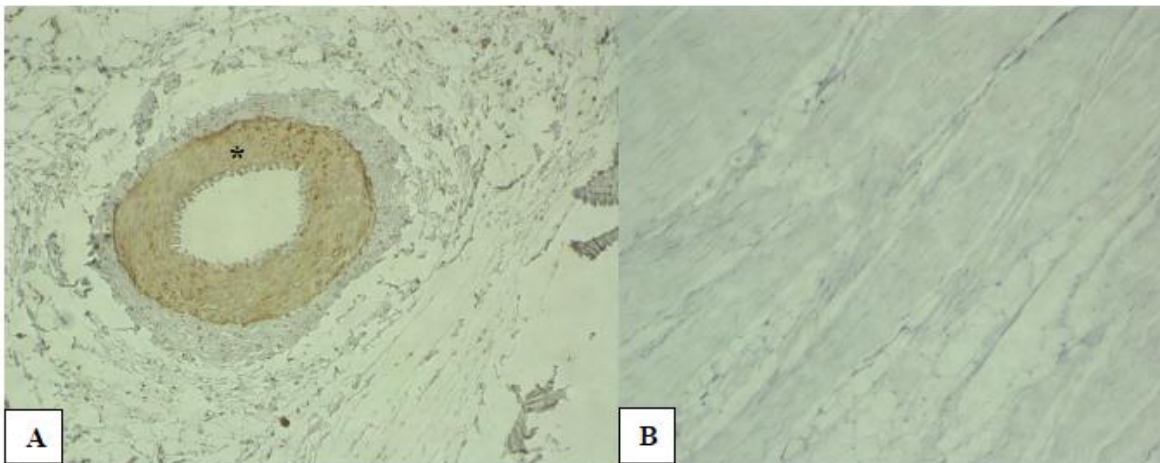


Figura 2 – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho ovino marcadas pela imuno-histoquímica e contracoradas pela Hematoxilina de Harris (A) e coradas pelo Azul de Toluidina (B). Observa-se que em A a musculatura lisa da artéria (*) foi marcada pela imuno-histoquímica e a região perivascular teve integridade comprometida pelas etapas da técnica, comparativamente ao corte de cápsula corada pela técnica de Azul de Toluidina (B). A e B, aumento de 100x.

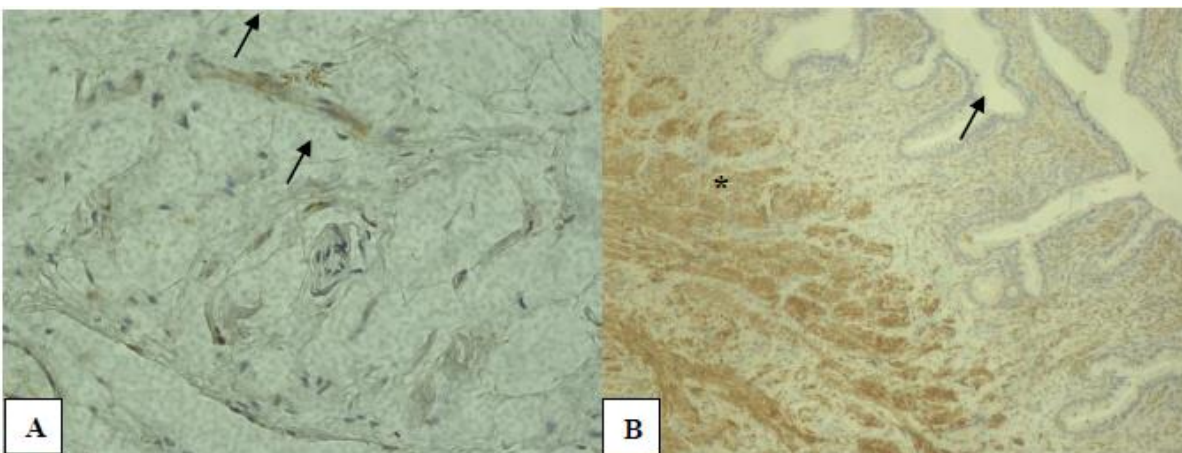


Figura 3 – Fotomicrografias de cápsula articular de joelho de ovelha (A) e cervice de ovelha (B) marcadas pela imuno-histoquímica e contracoradas pela Hematoxilina de Harris. As setas indicam reações inespecíficas à marcação de α -SMA e em B nota-se que a musculatura lisa da cervice encontra-se corada em maior intensidade (*) do que a coloração inespecífica (seta). A, aumento 400x. B, aumento de 100x.

Conclusão

O número de mastócitos encontrado em cápsula articular sadia do joelho de ovinos é baixo, porém estudos sobre cápsulas articulares lesionadas de ovinos devem ser conduzidos para confirmar a presença de miofibroblastos e avaliar a variação do número das células analisadas e a patofisiologia do desenvolvimento da contratura articular.

Agradecimentos

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado, ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC) e aos pesquisadores do Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, SP, pelo fundamental apoio técnico.

Referências bibliográficas

ALMEIDA, R.S.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M.; VERINAUD, L.M.C.; ARNS, C.W. Bovine respiratory syncytial virus: immunohistochemical detection in mouse and bovine tissues using a Mab against human respiratory syncytial virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.58, n.6, p.973-981, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000041&pid=S0102-0935200900040002800001&lng=en>. Acesso em: 15 de abril de 2018.

APPLEYARD, R. C., GHOSH, P., SWAIN, M. V. Biomechanical, histological and immunohistological studies of patellar cartilage in an ovine model of osteoarthritis induced by lateral meniscectomy. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.7, p. 281–294, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329303>>. Acesso em: 16 de abril de 2018.

CALLADO, A.K.C.; CASTRO, R.S.; TEIXEIRA, M.F.S. Lentivírus de pequenos ruminantes (CAEV e Maedi-visna): revisão e perspectivas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 87-97, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2001000300001> Acesso em: 25 de maio de 2018.

COHEN M.S., HASTINGS I.H. Post-traumatic contracture of the elbow. **The Journal of Bone and Joint Surgery**. v. 80B, p. 805-812, 1998. Disponível em: <<http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/80-B/5/805.full.pdf>> . Acesso em: 21 de novembro de 2018.

DAWSON, M. Pathogenesis of maedi-visna. **Veterinary Record**. v. 120, n.19, p. 451-454. 1987. Disponível em: <<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/120/19/451.abstract>> .Acesso em: 20 de novembro de 2018.

HILDEBRAND K.A. et al. Myofibroblast numbers are elevated in human elbow joint capsules following trauma. **Clinical Orthopaedics**. v.419, p.189-197. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15021153>> . Acesso em: 21 de novembro de 2018.

HILDEBRAND K.A., ZHANG M., HART D.A. Myofibroblast upregulators are elevated in joint capsules in post traumatic contractures. **Clinical Orthopaedics**. v.456, p.85-91, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17195814>> . Acesso em: 20 de novembro de 2018.

HILDEBRAND, K.A. et al. Cellular, matrix and growth factor components of the joint capsule are modified early in the process of post-traumatic contracture formation in a rabbit model. **Acta Orthopaedica**. v.79, n.1, p.116-125, 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18283583>> . Acesso em: 22 de novembro de 2018.

HILDEBRAND, K.A. et al. Joint Capsule Mast Cells and Neuropeptides are increased within Four Weeks of injury and remain elevated in Chronic stages of Post traumatic Contractures. **Journal of Orthopaedic Research**. v. 26, n.10, p. 1313-1319, 2008b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404724>> . Acesso em: 22 de novembro de 2018.

HILDEBRAND, K.A.; ZHANG, M.; HART, D.A. High rate of joint capsule matrix turnover in chronic human elbow contractures. **Clinical Orthopaedics**. v.439, p.228-234, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950173/>> Acesso em: 20 de novembro de 2018.

HOLY, C. E.; et al. In vivo models for bone tissue-engineering constructs. In: Davies J, (Ed). **Bone Engineering**. Toronto: Copyright. p. 496-504, 2000.

HÜBNER, S.O.; PESCADOR, C.; CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; SPILKI, F.R.; ROEHE, P.M. Otimização da imunistoquímica para detecção de herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em tecidos do sistema nervoso central fixados com formaldeído. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 57, n.1, p.1-6, 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352005000100001&script=sci_arttext> . Acesso em: 15 de maio de 2018.

LIMA, R.S. et al. Detecção imunistoquímica de receptores de estrógeno e progesterona no endométrio de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) durante o anestro pós-parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.4, p.791-798, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352011000400001&script=sci_arttext> . Acesso em: 15 de maio de 2018.

MONUMENT, M. J. et al. The mast cell stabilizer ketotifen, significantly reduces contracture severity and molecular manifestations of joint capsule fibrosis in a rabbit model of posttraumatic joint contractures. **The Journal of bone and joint surgery**. American. v. 92, n.6, p.1468-1477, 2010. Disponível em: < http://www.bjjprocs.boneandjoint.org.uk/content/93-B/SUPP_III/243.3.short> . Acesso em: 10 de maio de 2018.

MORREY B.F., ASKEW L.J., CHAO E.Y. A biomechanical study of normal functional elbow motion. **Journal of Bone and Joint Surgery**. v.63A, p.872-877, 1981. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7240327>> . Acesso em: 10 de maio de 2018.

ONU 2013. **Pior seca dos últimos 50 anos no nordeste brasileiro confirma estatísticas da onu sobre escassez**. Disponível em: <<http://www.onu.org.br/pior-seca-dos-ultimos-50-anos-no-nordeste-brasileiro-confirma-estatisticas-da-onu-sobre-escassez/>> . Acesso em: 22 de maio de 2013.

SPADARI, A. et al. Effects of intraarticular treatment with stanozolol on synovial membrane and cartilage in an ovine model of osteoarthritis. **Research in Veterinary Science**. v. 94, p. 379–387, 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528812003797>> . Acesso em: 22 de maio de 2018.

TAPPER, J.E. et al. In vivo measurement of the dynamic 3-D kinematics of the ovine stifle joint. **Journal of Biomechanical Engineering**. v.126, p.301-305, 2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179862>> . Acesso em: 20 de novembro de 2018.

TIMMERMAN L., ANDREWS J. Arthroscopic treatment of posttraumatic elbow pain and stiffness. **The American Journal of Sports Medicine**. v.22, p.230-235. 1994. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8198192>> . Acesso em: 20 de novembro de 2018.

TOLOSA, E. M. C; RODRIGUES, C.J.; BEHMER, O.A; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2 ed. São Paulo: Manole, p.331, 2003.

VOLPATO, R. et al. Imuno-histoquímica de útero e cérvix de cadelas com diagnóstico de piometra. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UNESP-Botucatu). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.64, n.5, p.1109-1117, 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-09352012000500004&script=sci_arttext> . Acesso em: 20 de maio de 2018.

ZUCCARI, D.A.P.C., et al. Polachini Immunohistochemical and molecular expression of laminin-332 gamma-2 chain in canine mammary tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.1, p.28-35, 2011. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000100005> . Acesso em: 20 de maio de 2018.

Recebido em 01/02/2019

Aceito em 18/03/2019