

IMUNORREATIVIDADE À GLICOPROTEÍNA-P NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO

GASPAR, L.F.J.^{1*}; AMARAL, A.S.²; BASSANI-SILVA, S.³; ROCHA, N.S.⁴

INTRODUÇÃO

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma neoplasia contagiosa e sexualmente transmissível que, em condições naturais, afeta somente caninos (ROGERS, 1997). O tumor é transmitido pela implantação de células tumorais viáveis nas mucosas, especialmente se existem abrasões ou perda da integridade da superfície (COHEN, 1985). Além do contato genital, o TVT também pode ser transmitido por hábitos sociais como farejar e lambar, o que explica os casos primários extragenitais nas mucosas nasal, oral e conjuntival (KROGER *et al.*, 1991; PÉREZ *et al.*, 1994). O tipo celular exato de origem do TVT não é conhecido. Ele tem sido definido histologicamente como um tumor indiferenciado de células redondas, provavelmente de origem reticuloendotelial (COHEN, 1985; MACEWEN, 1996). Estudos com técnicas de imunoistoquímica têm apontado para origem mesenquimal e histiocítica (TINUCCI-COSTA, 1999).

Dentre as várias modalidades de tratamento, como radioterapia, cirurgia ou criocirurgia, a quimioterapia é a aceita como mais efetiva (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Existem inúmeros relatos utilizando vincristina, vimblastina, doxorrubicina e ciclofosfamida como agentes únicos (ROGERS *et al.*, 1998; NAK *et al.*, 2005) ou combinados (CALVERT *et al.*, 1982; HOQUE *et al.*, 1995) para o tratamento do TVT. A terapia com sulfato de vincristina como agente único, em aplicações semanais, é o protocolo mais efetivo, sendo necessárias de quatro a oito aplicações intravenosas para a obtenção da cura (ERÜNAL-MARAL *et al.*, 2000). Em tumores resistentes à vincristina, a droga de escolha é a doxorrubicina (ROGERS, 1997; NAK *et al.*, 2005).

A resistência à quimioterapia é um grande obstáculo no tratamento de pacientes com câncer. Uma série de mecanismos pode contribuir para a resistência clínica à quimioterapia. Durante muitos anos, a maior parte dos estudos focalizou modificações no alvo celular da droga e na resistência resultante. No entanto, logo ficou claro que um grupo de indivíduos podia apresentar resistência cruzada a diversas drogas, as quais divergiam entre si quanto à estrutura, modo de ação e ao alvo celular. Este fenômeno de resistência a múltiplas drogas é multifatorial, podendo ser conferido por uma variedade de mecanismos celulares. Estes mecanismos estão relacionados com defeitos na regulação dos genes que controlam a apoptose, aumento dos mecanismos de detoxificação intracelular, alterações nos sistemas de reparo do DNA e pela ativação ou superexpressão de moléculas, como a glicoproteína-p, capazes de exportar os quimioterápicos para fora da célula ou de compartimentos celulares (MAIA & RUMJANEK, 2004).

A função normal da glicoproteína-p (gp-p) não é completamente compreendida, mas sabe-se que ela é expressa nas adrenais, rins, fígado, cólon, cérebro, pulmões, sangue periférico e medula óssea normais (ALEXANDROVA, 1998, THOMAS & COLEY, 2003). Ela faz parte da família de transportadores ABC, que funcionam como uma bomba de efluxo dependente da energia gerada pela hidrólise do ATP, capazes de translocar para o exterior da célula uma série de drogas, reduzindo a sua concentração a níveis pouco letais (THOMAS & COLEY, 2003; MAIA & RUMJANEK, 2004). Muitos tumores derivados destes tecidos expressam grandes quantidades de gp-p, o que pode explicar sua resistência intrínseca a quimioterápicos, comumente observada (BERGMAN, 2000).

¹Professor Adjunto Faculdade de Medicina Veterinária da UFPel, Pelotas, RS, lfigaspar@ibest.com.br

²Professora Adjunta do Centro de Ciências Rurais (CCR) de UFSM, Santa Maria, RS, anne.am@hotmail.com

³Doutoranda da Faculdade de Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, sabassani@yahoo.com.br

⁴Professora Adjunta da Faculdade de Veterinária e Zootecnia, UNESP, Botucatu, SP, rochanoeme@fmvz.unesp.br

Em oncologia humana, a importância clínica da MDR é demonstrada pela observação que níveis elevados de expressão de gp-p correlacionam-se positivamente com a falta de resposta ou de remissão após formas adequadas de quimioterapia (BERGMAN, 2000). Mealey *et al.* (1998) observaram que a gp-p canina funciona da mesma maneira que a homóloga no homem. Ginn (1996) padronizou o uso de três anticorpos monoclonais de glicoproteína-p (C494, C219 e JSB-1). A avaliação de tecidos caninos normais e neoplásicos revelou imunorreatividade satisfatória, indicando que a gp-p pode ser detectada nos tecidos de caninos processados rotineiramente. O uso de diferentes anticorpos monoclonais para a mesma molécula é recomendado, pois nem todos os epítomos na mesma molécula têm os mesmos aminoácidos na constituição (MONTERO, 2003).

Miyoshi *et al.* (2002) testaram a expressão de glicoproteína-p em amostras de 54 mastocitomas caninos, obtendo positividade em 26% das amostras. Bergman *et al.* (1996) constataram que os níveis de expressão da gp-p em linfomas caninos eram maiores na recaída e na necropsia do que no momento do diagnóstico. O mesmo estudo encontrou correlação negativa entre a expressão de gp-p e remissão e tempo de sobrevivência. Lee *et al.* (1996) observaram que a expressão da gp-p após a recidiva no linfoma canino era maior que a expressão inicial, concluindo que a expressão da gp-p antes do tratamento é um fator preditivo independente negativo de sobrevivência.

Este trabalho teve o propósito de verificar se células de tumor venéreo transmissível expressam glicoproteína-p, uma vez que tem sido observada crescente resistência à quimioterapia em pacientes com esta neoplasia.

MATERIAL E MÉTODO

Foram estudadas prospectivamente 103 amostras de TVT obtidas de cães, sem restrição de sexo, raça ou idade, atendidos com esta neoplasia no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP, campus Botucatu. As amostras foram obtidas por citologia aspirativa com agulha fina (calibre 24 $\frac{3}{4}$ G), sendo as células obtidas suspensas em 1,5ml de PBS gelado. Esta suspensão era então centrifugada a 550rpm durante três minutos em citocentrífuga, obtendo-se lâminas com concentrado celular em um botão de 0,5cm de diâmetro. As lâminas eram armazenadas em etanol 95% até o processamento da imunocitoquímica.

Para a imunomarcação foram utilizados os anticorpos antiglicoproteína-p clone C494¹ e clone 5B12². Como eram anticorpos monoclonais anti-humano, houve necessidade de padronização para uso em tecidos caninos. Para tanto, foram testados como formas de recuperação antigênica tampão citrato 10 μ mol (pH 6) em microondas e tampão EDTA (pH 8 e pH 9) em banho-maria a 96°C. Também foram testados bloqueios de marcação inespecífica (BSA 2%, por 1 hora em temperatura ambiente), bloqueios de proteína (*kit* CSA³) e de avidina e biotina⁴, tempo e temperatura de incubação. O protocolo adotado após a padronização está sumarizado a seguir.

As lâminas eram hidratadas por passagens em álcool 85%, água corrente e água destilada. Seguia-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes, banho em água corrente e água destilada e, por último, tampão tris⁵. As lâminas eram então secas, a área com o material delimitada com caneta⁶ e transferidas para uma bandeja com tampa, mantendo sempre as células umedecidas com tampão.

¹ Anti-glicoproteína-P humana de camundongo, clone C494, monoclonal, código 8720-01. Signet Laboratories, Inc. Dedham, MA, USA.

² Anti-p170/p-glycoprotein/MDR Ab-4 humana de camundongo, clone 5B12, monoclonal, código MS-1787-S0. LabVision, Fremont, CA, USA.

³ Catalyzed Signal Amplification (CSA) System, código K1500. DakoCytomation Denmark A/S. Glostrup, Dinamarca.

⁴ DAKO Biotin Blocking System, código X0590, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

⁵ 8,5g NaCl; 6g trizma base; 1l de água destilada, ajustando pH em 7,4.

⁶ Dako DakoCytomation Pen. DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca.

Para a diminuição de marcações inespecíficas e redução de fundo, antes da incubação com o anticorpo primário os preparados citológicos eram incubados com BSA 2% por uma hora em temperatura ambiente.

Os anticorpos diluídos em BSA 1% (1:100, clone C494; 1:10, clone 5B12) eram aplicados sobre as lâminas e incubados em câmara úmida a 4°C *overnight*. Seguiam-se duas lavagens em tris e incubação com anticorpo secundário por 30 minutos em temperatura ambiente. Após duas lavagens com tris era aplicado um sistema de anticorpo secundário e polímero associado a peroxidase¹, com incubação em temperatura ambiente durante uma hora e após lavados com dois banhos de tris.

Para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno 3'-3' diaminobenzidina² líquido, na diluição recomendada pelo fabricante, durante 5 minutos, ao abrigo da luz, seguindo-se a lavagem das lâminas durante 10 minutos em água corrente.

As lâminas eram contra-coradas com verde de metila por 5 minutos, lavadas com álcool isopropílico por 2 minutos (dois banhos), desidratadas em álcool absoluto (1 minuto), diafanizadas em xilol e montadas com resina sintética.

Para o controle positivo da glicoproteína-p foram usados cortes histológicos ou impressão de fígado canino e como controle negativo, amostras citológicas de TVT incubadas somente com o diluente do anticorpo primário.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico sob objetiva de 40x e os resultados expressos como percentual de células positivas em 10 campos aleatórios, contando-se no mínimo 100 células por amostra. Foram consideradas positivas as células com membrana citoplasmática e citoplasma marrom, independente da intensidade da marcação (GINN, 1996; MIYOSHI *et al.*, 2002). De acordo com o número de células positivas, a amostra era categorizada em um escore de um a três, da seguinte forma:

- negativo= amostra negativa;
- classe um= até 10% de células positivas;
- classe dois= entre 11 e 50% de células positivas;
- classe quatro= mais de 50% de células marcadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O anticorpo antiglicoproteína-p clone 5B12, testado, não apresentou marcação positiva nos tecidos que fisiologicamente expressam glicoproteína-p, tais como fígado e rim hígidos. Da mesma forma, também não demonstrou expressão antigênica nas células de TVT, mesmo seguindo as recomendações da literatura e do fabricante. Mesmo após as tentativas de recuperação antigênica por calor com EDTA e citrato e uso de sistemas secundários e de amplificação diferentes não houve sucesso. Embora, a exemplo de outros anticorpos, como o clone C494, a reação cruzada exista, neste caso não foi observada. O uso de diferentes anticorpos monoclonais para a mesma molécula pode ser recomendado, visto que nem todos os epítomos da molécula têm a mesma constituição de aminoácido (MONTERO, 2003). Provavelmente, a constituição dos aminoácidos do epítopo da célula de tumor venéreo transmissível não seja compatível com o clone 5B12, não havendo imunomarcção.

Quando utilizado o anticorpo antiglicoproteína-p clone C494, não foi necessário o uso de recuperação antigênica pelo calor, mas para a diminuição de marcações inespecíficas e redução de fundo, antes da incubação com o anticorpo primário os preparados citológicos foram incubados com BSA 2% por uma hora em temperatura ambiente. A substituição do complexo streptavidina-biotina por um sistema de anticorpo secundário e polímero associado à peroxidase, com incubação em temperatura ambiente durante uma hora, resultou na redução das marcações inespecíficas.

¹ DAKO LSAB+ kit, peroxidase, código K0690. Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

² DAB líquido Dako. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

O anticorpo antiglicoproteína-p clone C494 produziu marcação positiva satisfatória na diluição de 1:100, tanto dos controles positivos como das células de TVT, como descrito por Ginn (1996). As células de TVT tiveram marcação da membrana citoplasmática variando de discreta a intensamente corada, geralmente acompanhada de marcação citoplasmática difusa. A padronização deste anticorpo em preparados citológicos e histológicos constitui-se num parâmetro inovador para traçar prognóstico na oncologia de caninos e provavelmente pioneiro em medicina veterinária.

Das 103 amostras testadas, 57 (55,3%) apresentaram expressão da glicoproteína-p, em padrões variáveis de intensidade, e 46 foram negativas. A distribuição pelos escores está detalhada na Tabela 1.

TABELA 1 - Imunorreatividade à glicoproteína-p (clone C494, Signet) em amostras citológicas de tumor venéreo transmissível canino.

CRITÉRIO	ESCORE	AMOSTRAS	
		n	%
Nenhuma célula marcada	Negativo	46	44,7
De 1 a 10% de células positivas	Classe 1	11	10,7
De 11 a 50% de células positivas	Classe 2	41	39,8
Mais de 50% de células positivas	Classe 3	5	4,8
	Total	103	100

A expressão de glicoproteína-p pelo TVT, à semelhança do citado por Miyoshi et al. (2002), em mastocitomas caninos, e por Bergman *et al.* (1996) e Lee *et al.* (1996) em linfoma canino, sugere que ela possa desempenhar um papel importante na resistência à quimioterapia também nesta neoplasia.

De acordo com a citação de Ginn (1996), a partir da expressão dos padrões de glicoproteína-p foram criadas quatro categorias. Na primeira categoria estão aqueles tumores que expressam sempre a glicoproteína-p. Na segunda categoria estão os tumores que expressam às vezes a glicoproteína-p. Na terceira categoria, os tumores apresentam raramente a expressão de gp-p. A quarta categoria inclui os tumores que passam a expressar a gp-p após a quimioterapia. Em consideração a esta classificação, pode-se supor que o tumor venéreo transmissível esteja na segunda categoria.

CONCLUSÃO

Com base nos testes realizados o anticorpo antiglicoproteína-p clone 5B12 não apresentou marcação positiva, nem nas células de tumor venéreo transmissível, nem no controle positivo, não sendo um anticorpo adequado para uso em amostras citológicas de tecidos caninos. O anticorpo antiglicoproteína-p clone C494 produz marcação positiva satisfatória na diluição de 1:100 em células de tumor venéreo transmissível.

A expressão de glicoproteína-p pelo TVT pode estar envolvida na resistência à quimioterapia, já que mais de 55% das amostras expressam esta proteína. A determinação da reatividade pode se constituir numa ferramenta para determinação de prognóstico para esta neoplasia.

REFERÊNCIAS

ALEXANDROVA, R. Multidrug resistance and p-glycoprotein. *Exp. Pathol. Parasitol.*, v.1, p.62-66, 1998.

- BERGMAN, P.J. Multidrug resistance. In: BONAGURA, J.D. (Ed.). **Kirk's current veterinary therapy XIII: small animal practice**. Philadelphia : Saunders, 2000. Sec.6, p.479-482.
- BERGMAN, P.J., OGILVIE, G.K., POWERS, B.E. Monoclonal antibody C219 immunochemistry against P-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dogs with lymphoma. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 10, p. 354-359, 1996.
- CALVERT, C.A., LEIFER, C.E., MacEWEN, E.G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.181, p.163-164, 1982.
- COHEN, D. The canine transmissible venereal tumor: a unique result of tumor progression. **Adv. Cancer Res.**, v.43, p.75-112, 1985.
- ERÜNAL-MARAL, N., FINDIK, M., ASLAN, S. Use of exfoliative cytology for diagnosis of transmissible venereal tumour and controlling the recovery period in the bitch. **Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.**, v.107, n.5, p.175-180, 2000.
- GINN, P.E. Immunohistochemical detection of p-glycoprotein in formalin-fixed and paraffin-embedded normal and neoplastic canine tissues. **Vet. Pathol.**, v.33, p.533-541, 1996.
- HOQUE, M., PAWDE, A.M., SINGH, G.R. Combination chemotherapy in canine transmissible venereal tumor. **Indian Vet. J.**, v.72, p.973-975, 1995.
- KROGER, D., GREY, R.M., BOYD, J.W. An unusual presentation of canine transmissible venereal tumor. **Canine Pract.**, v.16, n.6, p.17-21, 1991.
- LEE, J.J. *et al.* P-glycoprotein expression in canine lymphoma. **Cancer**, v.77, p.1892-1898, 1996.
- MACEWEN, E.G. Transmissible venereal tumor. In: WITHROW, S.J., MACEWEN, E.G. **Small animal clinical oncology**. 2.ed. Philadelphia : Saunders, 1996. Cap.29C, p.533-538.
- MAIA, R.C., RUMJANEK, V.M. Mecanismos moleculares de resistência a múltiplas drogas In: FERREIRA, C.G., ROCHA, J.C. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu, 2004. 469p. Cap. 11, p.113-122.
- MEALEY, K.L. *et al.* Doxorubicin induced expression of P-glycoprotein in a canine osteosarcoma cell line. **Cancer Lett.**, v.126, n.2, p.187-192, 1998.
- MIYOSHI, N. *et al.* Immunohistochemical detection of p-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. **J. Vet. Med. Sci.**, v.64, p.531-533, 2002.
- MONTERO, C. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. **J. Histochem Cytochem**, vol.51, n1, p.1-4, 2003.
- NAK**
- PÉREZ, J., *et al.* Primary extragenital occurrence of transmissible venereal tumors: three case reports. **Canine Pract.**, v.19, n.1, p.7-10, 1994.
- ROGERS, K.S. Transmissible venereal tumour. **Compend. Contin. Educ.**, v.19, n.9, p.1036-1045, 1997.
- THOMAS, H., COLEY, H. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. **Cancer Control**, v.10, p.159-165, 2003.
- TINUCCI-COSTA, M. Canine transmissible venereal tumor. **Rev. Educ. Cont. CRMV-SP**, v.2, n.3, p.46-52, 1999.