

IMUNORREATIVIDADE À GLICOPROTEÍNA-P NOS DIFERENTES TIPOS CITOMORFOLÓGICOS DE 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 imunistoquímica têm apontado para origem mesenquimal e histiocítica (TINUCCI-COSTA, 1999).

TVT's de ocorrência natural produzem metástases em até 17% dos casos, de acordo com MacEwen (2001). As metástases podem ocorrer virtualmente em todos os órgãos, incluindo linfonodos superficiais e profundos das cavidades abdominal e torácica, subcutâneo, fígado, baço, rins pulmões e mediastino (FERREIRA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2006).

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, doxorubicina e ciclofosfamida como agentes únicos (ROGERS *et al.*, 1998) 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 doxorubicina (ROGERS, 1997; NAK *et al.*, 2005).

A citologia é o método de escolha para o diagnóstico de TVT, pois é uma técnica simples, minimamente invasiva, indolor e barata (BASSANI-SILVA *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2004). Amostras citológicas de TVT são geralmente multicelulares e contêm células redondas ou ovais, com bordos citoplasmáticos bem definidos. O núcleo, redondo ou oval, é freqüentemente excêntrico, de tamanho variável, com cromatina grosseira e granular, e com um ou dois nucléolos proeminentes (ROGERS, 1997). A relação núcleo:citoplasma é relativamente alta (BOSCOS *et al.*, 1999). Até 2003, a literatura sobre tumor venéreo transmissível tanto de ocorrência natural como de transplantes experimentais, não registrava diferenças de tipos celulares, apesar das descrições encontradas que apóiam estas diferenças, como ausência de vacúolos citoplasmáticos (ROGERS, 1997) e a presença de células maiores e mais ovóides em relação à morfologia típica do TVT (BOSCOS *et al.*, 1999). Varaschin *et al.* (2001) registraram que TVT's malignos apresentam citoplasma abundante. Esta morfologia corresponde ao TVT plasmocitóide que, em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, mostrou ser mais agressivo que a forma linfocitóide (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005). O Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP, em Botucatu, adota a classificação do TVT

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

baseada na citomorfologia desde 1994 (BASSANI-SILVA *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2004), pela hipótese de que esta neoplasia apresenta diferentes linhagens de variada agressividade.

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, relacionados com defeitos na regulação da apoptose, aumento da detoxificação intracelular, alterações nos sistemas de reparo do DNA e ativação ou superexpressão de moléculas, como a glicoproteína-p, capazes de exportar os quimioterápicos para fora da célula (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).

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) em tecidos caninos normais e neoplásicos, com imunorreatividade satisfatória, indicando que a gp-p pode ser detectada nos tecidos de caninos processados rotineiramente. Trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa já comprovou a expressão de glicoproteína-p pelo TVT (GASPAR, 2005).

Este trabalho teve o propósito de verificar se os diferentes grupos citomorfológicos de tumor venéreo transmissível (linfocitóide, plasmocitóide e misto) expressam glicoproteína-p na mesma intensidade, uma vez que tem sido observada crescente resistência à quimioterapia em pacientes com esta neoplasia, especialmente naquela de padrão plasmocitóide. Buscou-se também verificar se existe diferença de expressão deste marcador em TVTs primários e nas suas metástases.

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da FMVZ-UNESP, *campus* Botucatu. Foram utilizados cães, sem restrição quanto a sexo, idade ou raça, com diagnóstico clínico e citológico de TVT, atendidos no Hospital Veterinário da FMVZ-UNESP. A inclusão dos pacientes foi condicionada à livre aceitação e consentimento dos proprietários.

Cada massa tumoral, considerada uma unidade experimental, foi avaliada de acordo com sua localização (em *genital* ou *extragenital*) e comportamento biológico (em *primária*, *metastática* ou *recorrente*).

Amostras foram coletadas de 103 massas tumorais por citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) para a caracterização citomorfológica. Duas lâminas de cada amostra foram deixadas secar ao ar, fixadas em metanol e coradas pelo método de Giemsa.

Agulhas de calibre 24³/₄G foram utilizadas independentemente do tamanho da massa aspirada. Nos casos em que a visualização da massa genital não era possível, bem como em casos de massas intra-nasais, escova ginecológica foi utilizada para a coleta das células. Uma segunda amostra foi obtida, 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.

Nas lâminas coradas por Giemsa, no mínimo cem células de cada amostra foram avaliadas, em pelo menos dez campos não sobrepostos. Cada uma das células foi classificada em linfocitóide ou plasmocitóide e a amostra incluída em um dos grupos experimentais (L, M ou P), de acordo com o seguinte padrão:

- Grupo Linfocitóide (L): predominância de 60% ou mais de células de TVT com morfologia redonda, citoplasma escasso e finamente granular, com a presença de vacúolos acompanhando a periferia celular, núcleo redondo com cromatina grosseira e um ou dois nucléolos salientes (Fig. 1A).
- Grupo Plasmocitóide (P): predominância de 60% ou mais de células de TVT com morfologia ovóide, citoplasma mais abundante (menor proporção núcleo:citoplasma) e núcleo localizado excentricamente (Fig. 1B).
- Grupo Misto (M): celularidade mista entre os tipos celulares linfocitóide e plasmocitóide, sem que nenhum ultrapasse 59% do total.

Para a imunomarcação foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-humano antiglicoproteína-p clone C494¹. As lâminas com o citocentrifugado, armazenadas em etanol 95%, eram hidratadas por passagens em álcool 85%, água corrente e água destilada. Seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10 volumes, banho em água corrente e água destilada e, por último, tampão tris². As lâminas eram então secas, a área com o material delimitada com caneta³ e transferidas para uma bandeja com tampa, mantendo sempre as células umedecidas com tampão.

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.

O anticorpo diluído em BSA 1% (1:100, clone C494) 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 peroxidase⁴, 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' diaminobenzidina⁵ 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.

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

² 8,5g NaCl; 6g trizma base; 1l de água destilada, ajustando pH em 7,4.

³ Dako DakoCytomation Pen. DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca.

⁴ DAKO LSAB+ kit, peroxidase, código K0690. Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA.

⁵ DAB líquido Dako. DakoCytomation. Carpinteria, CA, USA.

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). Para a amostra ser considerada positiva, mais de 10% das células analisadas deveriam estar marcadas. As amostras foram comparadas de acordo com o tipo citomorfológico e comportamento biológico e analisadas pelo teste de Chi Quadrado (χ^2) com a aplicação do teste de Goodman para comparação de proporções multinominais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de TVT tiveram marcação da membrana citoplasmática variando de discreta a intensamente corada, geralmente acompanhada de marcação citoplasmática difusa. Das 103 amostras testadas, 47 (45,63%) apresentaram expressão da glicoproteína-p, em padrões variáveis de intensidade, e 56 (54,37%) foram negativas.

O grupo plasmocitóide apresentou uma imunorreatividade significativamente maior em relação ao grupo linfocitóide (Tabela 1). Portanto, comparando os três tipos, de forma preliminar, podemos considerar que o tipo plasmocitóide apresenta um potencial para expressar resistência à droga.

TABELA 1 – Número de casos (*n*) e percentagem (%) de marcação da glicoproteína-p em amostras dos diferentes grupos citomorfológicos do tumor venéreo transmissível.

GRUPO	POSITIVO		NEGATIVO		TOTAL
	<i>n</i> (casos)	%	<i>n</i> (casos)	%	
Linfocitóide	4 ^a	15,79	15	84,21	19
Misto	14 ^{ab}	43,75	18	56,25	32
Plasmocitóide	29 ^b	55,76	23	44,24	52

^{a,b} Letras diferentes representam diferenças significativas para $p < 0,05$ (Teste de Goodman para contraste entre proporções multinominais)

Quando os preparados citológicos foram reagrupados em massas primárias em não primárias (Tabela 2), observou-se que a glicoproteína-p apresentou imunorreatividade superior (58,80%) no grupo de massas não primárias, comparado com o das massas primárias (38,58%), sem que houvesse diferença significativa. Este resultado sugeriu que as neoplasias não primárias podem apresentar um potencial para expressar resistência à quimioterapia.

TABELA 2 – Percentagem de marcação da glicoproteína-p em amostras de neoplasias primárias e não primárias no tumor venéreo transmissível.

Glicoproteína-p	PRIMÁRIO		NÃO PRIMÁRIO	
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Marcação positiva	27	38,58	19	58,80
Marcação negativa	43	61,42	14	41,20
Total	70	100	33	100

$p = 0,11$ pelo teste χ

A hipótese de que o TVT apresenta diferentes linhagens de variada agressividade já motivava o uso desta classificação desde 1994 pelo Serviço de Patologia Veterinária da FMVZ-UNESP de Botucatu (BASSANI-SILVA *et al.*, 2003; AMARAL *et al.*, 2004), já que os TVTs plasmocitóides apresentam alta frequência de anormalidades nucleares, resistência aumentada à ação antitumoral da própolis, além de que quase todos os casos de metástases são do tipo plasmocitóide (AMARAL, 2005; BASSANI-SILVA, 2005; GASPAR, 2005). Neste contexto, associado à maior expressão de glicoproteína-p, conclui-se que o padrão plasmocitóide é mais agressivo, ou mais maligno, que os tipos linfocitóides ou mistos.

Estes achados estão de acordo com o observado no experimento de Lee *et al.* (1996), que concluíram que a expressão da gp-p antes do início do tratamento é um fator preditivo independente negativo de sobrevivência.

Estudo semelhante realizado por BERGMAN *et al.* (1996) em cães com linfoma constatou níveis de expressão da gp-p maiores na recidiva 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.

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.

CONCLUSÃO

A expressão de glicoproteína-p pelo TVT pode estar envolvida na resistência à quimioterapia. A expressão superior pelos tumores do tipo plasmocitóide apontam para maior malignidade desta linhagem, conforme já sugerido por outros estudos do nosso grupo. A determinação da reatividade pode se constituir numa ferramenta para determinação de prognóstico para esta neoplasia.

REFERÊNCIAS

- AMARAL AS. **Tumor venéreo transmissível canino: critérios citológicos de malignidade e caacterização citomorfológica correlacionada a imunocitoquímica e lesões de DNA.** Tese (Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista) Botucatu, 2005.
- AMARAL AS *et al.* Diagnóstico citológico do tumor venéreo transmissível na região de Botucatu, Brasil (estudo descritivo: 1994-2003). **Rev. Port. Ciênc. Vet.**, v.99, n.551, p.167-171, 2004.
- ALEXANDROVA, R. Multidrug resistance and p-glycoprotein. **Exp. Pathol. Parasitol.**, v.1, p.62-66, 1998.
- BASSANI-SILVA S. **Efeito da própolis sobre a agressividade do tumor venéreo transmissível canino: ensaios in vitro.** Dissertação (Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista) Botucatu, 2005.
- BASSANI-SILVA S *et al.* Tumor venéreo transmissível – revisão. **Revista Pet & Food & Health & Care**, n.2, p.77-82, 2003.
- 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.
- BOSCOS CM, TONTIS DK, SMARTZI FC. Cutaneous involvement of TVT in dogs: a report of two cases. **Canine Pract.**, v.24, n.4, p.6-11, 1999.

- 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.
- FERREIRA AJA *et al.* Brain and ocular metastases from a transmissible venereal tumour in a dog. **J. Small Anim. Pract.**, v.41, n.4, p.165-168, 2000.
- GASPAR LFJ. **Caracterização citomorfológica do tumor venéreo transmissível canino correlacionada com danos citogenéticos, taxa de proliferação e resposta clínica à quimioterapia.** Tese (Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista), Botucatu, 2005.
- 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.
- PARK MS *et al.* Disseminated transmissible venereal tumor in a dog. **J Vet.Diagn.Invest.**, v.18, n.1, p.130-133, 2006.
- 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.
- ROGERS KS, WALKER MA, DILLON HB. Transmissible venereal tumor: a retrospective study of 29 cases. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.34, n.6, p.463-470, 1998.
- 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.
- VARASCHIN MS *et al.* Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clín. Vet.**, v.6, n.32, p.332-338, 2001.