CLAUDIA PRADO DE BRITO

Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e híginas em diferentes fases do ciclo estral

São Paulo
2004

CLAUDIA PRADO DE BRITO

Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e híginas em diferentes fases do ciclo estral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira

São Paulo
2004

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1380
FMVZ

Brito, Claudia Prado de

Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e híginas em diferentes fases do ciclo estral / Claudia Prado de Brito. – São Paulo : C. P. Brito, 2004.

69 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2004.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira.

1. Imunoistoquímica. 2. Receptores de esteróides.
3. Neoplasias. 4. Genitália. 5. Cadelas. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRITO, Claudia Prado de

Título: Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e hígdas em diferentes fases do ciclo estral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data:___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedico este projeto de vida
aos meus pais, pela constante
dedicação, eterno amor e
confiança.

Ao Rafael, pela imensurável
alegria de tê-lo em minha
vida.

Historinha

Tudo o que vivemos e enfrentamos, reflete no que somos e ,hoje, tudo o que sou, devo a **minha família**. Devo ao constante prazer de contar com a alegria, a sabedoria e ajuda de meu **Pai**; a cumplicidade, amor e constante presença da minha **Mãe**; ao exemplo, admiração e fortaleza da minha irmã **Carla**; ao sorriso maroto e ternura do meu irmão **Tico** e finalmente dos abraços gostosos e da amizade do meu irmão **Pety**. **AMO VOCÊS** e obrigada por estarem presentes em minha vida.

É claro que a família sempre cresce e não posso deixar de lembrar dos meus lindos sobrinhos, **Fernanda, Ricardo e Felipe** que hoje refletem a alegria e o prazer de viver e agradecer ao constante apoio do meu cunhado **Paulo**, "o melhor cunhado que eu tenho" e o carinho das minhas cunhadinhas **Dani e Aline**.

A paixão pela veterinária surgiu quando menina: se enraizou depois da minha primeira cadelinha, **Leslie** (*in memorian*); abalou-se com a perda da **Danka** e voltou a florescer com a **Nani** (minha companheira), **Kiara e Guina** as mais novas mascotes. A luta no vestibular foi árdua, mas o resultado gratificante: **USP**. Os anos na faculdade foram maravilhosos e jamais esquecerei todos os amigos que fiz. A vocês, o meu muito obrigado!

Formatura, colação de grau e iniciava-se mais uma batalha! Neste momento apareceu quem eu hoje considero a minha "fada madrinha": **Clair**, que acreditou em mim, no meu potencial e durante cinco anos me acolheu e ensinou. Mas quando ela achava que podia se "livrar de mim", lá estava eu, suplicando pela pós-graduação. E mais uma vez me estendeu a mão. E agora aqui estamos - são oito anos de relacionamento que a cada dia cresce, uma parceria que deu certo. Obrigada por tudo!!

Os anos passados na Obstetrícia com certeza foram os que mais me marcaram, pois conheci os meus verdadeiros amigos: **Léo**, com sua vivacidade e companheirismo; **Maurício**, com seu profissionalismo e ternura; **Paulo (Fifi)** com seu carinho e amizade; **Marcelo** com seu caráter e exemplo e **RAFAEL** que além da minha eterna amizade conquistou meu coração e se revelou um excelente profissional, um companheiro exemplar ao qual eu reverencio com **toda a minha admiração e meu amor**. E na área

profissional: **Denise Simões** com sua energia e meiguice; **Júlia Habu** com todo seu conhecimento e **Bibi** com sua alegria e apoio profissional exemplar.

Ao longo desses três anos de mestrado não posso deixar de agradecer ao **Fábio** que abriu portas para a realização deste projeto, e através dele conhecer os profissionais do Hospital do Câncer que me acolheram e tornaram todo esse projeto possível. Ao **Prof. Dr. Fernando Soares** minha completa admiração pelo grande profissional, à **Alexandra** pela sua simpatia, ao **César** pela sua paciência e **Ivan** pelo seu constante bom humor, os meus agradecimentos.

Nesta jornada pude me deparar com **Camila** grande amiga, que acreditou no meu potencial; **Sandra** com sua generosidade e apoio nos momentos difíceis e **Karina** com sua sinceridade e leal amizade. Vocês estão do "lado esquerdo do peito" (Milton Nascimento). Lembrar também minhas mais recentes conquistas: **Solange**, que me faz acreditar o quanto é bom ser veterinária e **Ione**, que me ensina a cada dia o prazer e razão de viver.

Não poderia deixar de mencionar pessoas fundamentais na realização deste sonho: minhas queridas **Maria Luísa (Maú)**, **Maria Helena** e **Érica** pelo apoio laboratorial e simpatia constante; ao **Marcílio** pelo seu apoio estatístico e irreverência e à **Prof. Dra Maria Luiza Zaidan Dagli** pela paciência e por ceder o seu espaço e seus pós-graduandos para a finalização do trabalho. A vocês muitíssimo obrigada!!!!

Aos funcionários da Obstetrícia **Beth**, **Laércio** e **Nelson**, obrigada pelo carinho, lealdade e atenção.

Agradeço também ao Departamento de Reprodução Animal pela oportunidade e exemplo na formação de bons profissionais; à **FAPESP** pelo apoio financeiro e a todos os **animais** e proprietários que se dispuseram a me ajudar e tornar este momento possível.

RESUMO

BRITO, C. P. **Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e híginas em diferentes fases do ciclo estral.** [Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors on transmissible venereal tumour and vaginal tissues on affected and non affected bitches in different estrous fase]. 2004. 69 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

O tumor venéreo transmissível (TVT) é uma das neoplasias de maior incidência na espécie canina acometendo principalmente o trato genital masculino e feminino. Embora o tratamento de escolha seja a quimioterapia, a resistência às drogas tem sido um fenômeno freqüentemente observado na prática clínica. A determinação dos receptores esteróides (estrógeno e progesterona) por imunoistoquímica em tecidos normais e tumorais de humanos e várias espécies animais, tem mostrado grande importância tanto na avaliação prognóstica da doença tumoral, como também na possibilidade de tratamentos hormonais como adjuvantes à quimioterapia. Os objetivos desta pesquisa foram avaliar a expressão e comparar a concentração dos receptores de estrógeno α (RE- α) e progesterona (RP₄) no tecido vaginal íntegro de fêmeas híginas e no tecido vaginal e tumoral de fêmeas portadoras de TVT, nas fases do ciclo estral. Foram utilizadas 58 cadelas divididas em grupo experimental (portadoras de TVT) e grupo controle (fêmeas híginas), agrupadas segundo a fase do ciclo estral determinada por citologia vaginal, dosagem hormonal e aspecto macroscópico dos ovários. Sob anestesia geral, foram colhidos fragmentos da vagina e do tecido tumoral e estes fixados, blocados em parafina e posteriormente submetidos a imunoistoquímica. Nas cadelas do grupo controle houve maior expressão dos RE- α no anestro, proestro e estro ($p < 0,05$) em relação ao diestro.

Nas fêmeas do grupo experimental houve maior expressão dos RE- α no diestro ($p < 0,05$) em relação ao estro, porém não mostrou diferença significativa quando comparada com o anestro. Não houve diferença estatística para os RP₄, nas fases do ciclo estral para os animais do grupo controle e no epitélio vaginal das fêmeas do grupo experimental não houve positividade em nenhum dos fragmentos avaliados. Não se observou positividade para RE- α e RP₄ no TVT, porém o endotélio de vasos sanguíneos do tumor apresentou expressão de RE- α em algumas amostras. Concluiu-se que a expressão dos RE- α nos tecido vaginal das cadelas híginas e de cadelas portadoras de TVT, tem expressão diferente em função do hormônio esteróide circulante, porém não se expressa no tecido tumoral.

Palavras-chave: Imunoistoquímica. Receptores de esteróides. Neoplasias. Genitália. Cadelas.

ABSTRACT

BRITO, C. P. **Immunohistochemical evaluation of estrogen and progesterone receptors in transmissible venereal tumour and vaginal tissues of affected and non-affected bitches in different estrous phases.** [Avaliação imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona no tumor venéreo transmissível (TVT) e tecido vaginal de cadelas portadoras e híginas em diferentes fases do ciclo estral]. 2004. 69 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

One of the most frequent canine neoplasias is the Transmissible Venereal Tumour (TVT) which affects male and female genital tract. In clinical routine the standard treatment is chemotherapy, to which nevertheless drug resistance is a common feature. Immunohistochemical determination of steroid hormone receptors (estrogen and progesterone) in normal and tumoral tissues of humans and several other species is of great relevance for prognostic evaluation of oncological patients, as well as for the decision of whether to make use of hormonal therapy in association to chemotherapy. The aim of this research was to determine immunohistochemically estrogen (ER- α) and progesterone (PR₄) receptors expression in vaginal tissue of non-affected bitches and in vaginal and tumoral tissues of TVT affected bitches. Fifty-eight bitches were equally divided in 2 groups: experimental group (TVT) and control group (non-affected). Canine estrous cycle phases were determined by means of vaginal cytology, hormonal assay and macroscopic appearance of ovaries. Samples from vaginal and tumoral tissues were obtained with bitches submitted to general anesthesia. Samples were fixed in 10% buffered formaldehyde and then mounted in paraffin-embedded sections. Anestrous, proestrous and estrous control females presented higher ER- α expression than diestrous bitches. Within the experimental group, there was statistical difference between estrous and diestrous phases, being ER- α expression higher for diestrous bitches. However, no significant difference in

relation to anestrus females was established. In relation to RP₄ expression, no difference among estrous cycle phases of the control group was verified. Furthermore, no RP₄ expression was noted in vaginal tissue of TVT affected females. In tumoral tissues ER- α and RP₄ were not expressed, although some samples presented ER- α expression in blood vessels' endothelium. In conclusion, different ER- α expression was verified in vaginal tissue of experimental and control bitches under distinct steroid influence, whereas no ER- α expression in tumoral tissues was evidenced.

Key words: Immunohistochemistry. Steroid Receptors. Neoplasia. Genital. Bitches.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA.....	20
2.2	TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL.....	27
3	MATERIAL E MÉTODO	31
3.1	ANIMAIS.....	32
3.2	CRITÉRIO DE INCLUSÃO.....	32
3.3	CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO.....	33
3.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
3.4.1	Colheita dos fragmentos.....	33
3.4.2	Colheita do sangue.....	34
3.4.3	Determinação dos hormônios esteróides no soro sanguíneo.....	34
3.4.4	Método empregado para avaliação da fase do ciclo estral.....	35
3.4.5	Determinação dos receptores de estrógeno e progesterona (imunoistoquímica).....	36
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4	RESULTADOS	40
4.1	PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DOS RADIOIMUNENSAIOS.....	41
4.2	CONCENTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS.....	42
4.3	LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES.....	43
4.4	IMUNOISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO α (RE- α) NO TECIDO VAGINAL E TUMORAL.....	44

4.5	IMUNOISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP ₄) NO TECIDO VAGINAL E TUMORAL.....	45
5	DISCUSSÃO.....	51
5.1	TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL.....	52
5.2	LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES.....	54
5.3	IMUNOISTOQUÍMICA DOS RE- α NO EPITÉLIO VAGINAL DO GRUPO EXPERIMENTAL E CONTROLE.....	55
5.4	IMUNOISTOQUÍMICA DOS RP ₄ NO EPITÉLIO VAGINAL DO GRUPO EXPERIMENTAL E CONTROLE.....	57
5.5	IMUNOISTOQUÍMICA DOS RE- α E RP ₄ NO TVT.....	58
6	CONCLUSÃO.....	60
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
	REFERÊNCIAS.....	64

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A determinação dos receptores esteróides (estrógeno e progesterona) por imunoistoquímica em tecidos normais e tumorais de humanos e várias espécies animais, tem mostrado grande importância tanto na avaliação prognóstica da doença tumoral, como também na possibilidade de tratamentos hormonais como adjuvantes à quimioterapia.

O conhecimento da expressão fisiológica dos receptores esteróides nos diferentes tecidos alvo é importante já que auxilia no estudo de afecções que podem ser influenciadas pelos hormônios.

Em humanos, vários estudos correlacionaram os tumores do sistema urogenital com a presença de receptores esteróides. Nas neoplasias do trato genital benignas ou malignas bem diferenciadas, os receptores para progesterona aparecem em maior quantidade do que os de estrógeno e a resposta de cada tipo tumoral é diferente em relação aos hormônios (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000; REICH et al., 2000; SABINI; CHUMAS; MANN, 1992). Nas neoplasias classificadas como malignas ou pouco diferenciadas os receptores geralmente estão ausentes ou são encontrados em pequena quantidade, indicando a importância da avaliação dos receptores no tecido afetado para o prognóstico da doença (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000; REICH et al., 2000; SABINI; CHUMAS; MANN, 1992). Já os tumores mamários benignos e o tecido mamário normal em humanos, mostram menor quantidade de receptores esteróides positivos quando comparados aos carcinomas e adenocarcinomas de mama, mostrando a individualidade de cada tipo tumoral e a necessidade de estudos específicos para cada um (DONNAY et al., 1995).

Nas cadelas, pouco se conhece a respeito da expressão dos receptores hormonais nas neoplasias vaginais, ovarianas e uterinas. As correlações entre receptores de estrógeno e progesterona com as neoplasias foram estudadas em tumores mamários. Aproximadamente 80% dos tumores e 95% dos tecidos mamários normais expressam concentrações detectáveis de receptores de estrógeno e progesterona (DONNAY et al., 1995; DONNAY et al., 1996). Os receptores de estrógeno apresentam concentração mais alta no tecido mamário normal do que no tumoral, enquanto os receptores de progesterona têm expressão maior no tecido mamário tumoral. Como já citado em humanos, os tumores mamários malignos pouco diferenciados nas cadelas, expressam baixas concentrações de receptores em relação aos benignos e malignos bem diferenciados (DONNAY et al., 1995).

Na espécie canina, das afecções vaginais que acometem os animais o tumor venéreo transmissível (TVT) é a mais usual. Apesar da possibilidade de ocorrer metástases, tem natureza benigna, acometendo principalmente o trato genital masculino e feminino (VERMOOTEN, 1987) de animais somente da espécie canina. A distribuição geográfica predomina principalmente em países de climas tropical e subtropical como os da América do Sul e África (ROGERS; WALKER; DILLON, 1998; VARASCHIN et al., 2001). Não existe predisposição racial ou sexual para o TVT de ocorrência natural, porém, parece ser mais comum em animais jovens, errantes e sexualmente ativos (ROGERS; WALKER; DILLON, 1998; VARASCHIN et al., 2001; VERMOOTEN, 1987).

Na prática clínica, o tratamento de escolha ainda é o quimioterápico (AMBER et al., 1992; GONZALEZ et al., 2000), entretanto a resistência às drogas é um fenômeno frequentemente observado por médicos e veterinários que assistem à

pacientes com câncer (ALLEN et al., 2000; BERGMAN et al., 1995; BUENO et al., 2003). Vários fatores podem contribuir para a resposta ineficaz ao tratamento quimioterápico, dentre eles a disposição fisiológica (absorção, metabolização, distribuição e eliminação) das drogas quimioterápicas; a resistência temporária, que está associada a erros de dose do quimioterápico, via de administração e mudança de horário; a presença de proteína de membrana (glicoproteína P); e os fatores de resistência à múltiplas drogas (MDRs) (ALLEN et al., 2000; BERGMAN; OGILVIE, 1995). A glicoproteína P está fisiologicamente presente na membrana plasmática de vários órgãos, com função ainda desconhecida, mas na presença de metabólitos de substâncias quimioterápicas tem sua expressão aumentada, agindo como uma bomba de expulsão, retirando a droga do meio intracelular tumoral, impedindo a sua ação. Algumas drogas e hormônios atuam como moduladores da glicoproteína P e MDRs e podem melhorar a resposta do organismo, diminuindo a expressão desses genes (BERGMAN; OGILVIE, 1995).

Observações durante os anos na rotina do HOVET-USP, constatou-se que cadelas com TVT que entravam em CIO durante o tratamento quimioterápico voltavam a apresentar crescimento do tumor e menor resposta à terapia instituída, fato este que suscitou a possível associação entre as alterações hormonais fisiológicas e o comportamento do TVT.

Atualmente na medicina veterinária, linhas de pesquisa nas quais o principal enfoque é entender a ação dos hormônios na fisiologia e principalmente patologias reprodutivas ainda são escassas. O desconhecimento dos mecanismos de atuação dos hormônios e da expressão dos seus receptores impede o uso da terapia hormonal para determinadas afecções.

Ainda, é importante que se possa fornecer ao proprietário do animal informações mais precisas sobre a evolução e o prognóstico da doença e as possibilidades de resposta à terapia instituída, uma vez que os receptores esteróides podem ser expressos de maneira distinta em função da malignidade da neoplasia.

Fundamentado no pouco conhecimento do mecanismo dos hormônios e na expressão dos receptores esteróides no tecido vaginal e tumoral aliado ao fato de a literatura não apresentar dados referente ao comportamento desses receptores nas diferentes afecções do sistema genital em cadelas, procuramos testar as seguintes hipóteses:

- Existem receptores de estrógeno e progesterona no TVT?
- Se existem, sua expressão é igual ao da vagina íntegra?
- Sofrem variação de expressão sob influência do estrógeno e da progesterona circulante?

Para testar tais hipóteses, o presente estudo teve como objetivos avaliar a expressão e comparar as concentrações de receptores estrogênicos e de progesterona no tecido vaginal de fêmeas híginas e no tecido vaginal e tumoral de fêmeas portadoras de tumor venéreo transmissível em diferentes fases do ciclo estral, para futuramente avaliar o emprego da hormonioterapia ou da castração do animal antes do tratamento, como complemento na resolução de afecções que apresentam restrições terapêuticas.

Para que os objetivos fossem alcançados foram realizadas as seguintes etapas:

- 1) Determinar por imunoistoquímica a expressão de receptores de estrógeno e progesterona no tecido vaginal íntegro de fêmeas híginas e no tecido vaginal e tumoral de fêmeas portadoras de TVT.

- 2) Avaliar a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona na vagina íntegra de fêmeas hípidas e portadoras de TVT nas diferentes fases do ciclo estral;
- 3) Avaliar a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona no TVT nas diferentes fases do ciclo estral;
- 4) Comparar a expressão dos receptores para estrógeno e progesterona nas diferentes fases do ciclo estral entre os dois grupos.

2 – Revisão de Literatura

A capacidade de resposta do organismo depende da interação de dois mecanismos de controle: o sistema nervoso e o sistema endócrino. A estimulação do sistema endócrino resulta na liberação de hormônios que através da corrente sanguínea atinge os tecidos alvos. Os hormônios esteróides tem múltiplos efeitos e podem entrar na célula por difusão ou transporte ativo. A ação desses hormônios é mediada pela ligação ao seu receptor específico no núcleo ou citoplasma celular, levando a ativação dos genes responsivos aos esteróides e modificando a resposta celular e tecidual dos órgãos alvo (WANG; ERIKSSON; SAHLIN, 2000, WOLF; WANDT; JONAT, 1991).

2.1 RECEPTORES DE ESTRÓGENO E PROGESTERONA

A concentração intracelular dos receptores esteróides é um fator importante que determina a resposta hormonal e vários fatores de interação controlam os níveis dos receptores esteróides. O complexo receptor - esteróide pode estimular a transcrição do RNAm e assim aumentar a síntese de novas moléculas de receptor. O complexo formado pode ser reutilizado sendo convertido a uma forma não ligante e subseqüentemente ser ativado para uma forma ligante ou ser diretamente reciclado como uma forma ligante ativa. Alternativamente o receptor pode simplesmente sofrer degradação para uma forma inativa (WILSON et al., 1998).

Segundo Wilson et al. (1998), fatores de crescimento parecem ser capazes de ativar alguns receptores esteróides, particularmente o receptor de estrógeno

humano. Em culturas celulares o IGF-I (fator crescimento dependente de insulina), EGF (fator de crescimento epidérmico) e TGF- α (fator de crescimento transformador), podem estimular a transcrição dos genes alvos para estrógeno, pela ativação do receptor de estrógeno humano em uma forma de ligação independente. O EGF age via seu próprio receptor de membrana, causando crescimento uterino em ratas ovariectomizadas, mecanismo similar ao causado pelo estrógeno. De fato, o EGF atua conduzindo os receptores de estrógeno livres para a superfície nuclear e ativa novos genes para receptores de estrógeno (mecanismo este conhecido como “cross-talk”) em ratas e este efeito do EGF pode ser bloqueado pela administração de um antiestrogênico puro.

Inicialmente o método utilizado para determinar os receptores esteróides era o bioquímico, baseado na mensuração de sítios específicos de ligação (hormônio-receptor) utilizando homogeneizados de tecidos com receptor associados a ligantes radioativos (COCK; DUCATELLE; LOGGHE, 1997). Existem algumas limitações para este tipo de técnica tais como: a necessidade de grande quantidade de tecido e da homogeneização do mesmo, além da impossibilidade de distinção do tipo celular (normal ou tumoral) e da avaliação retrospectiva do material (SABINI; CHUMAS; MANN, 1992).

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos contra as proteínas de receptores de estrógeno e progesterona ofereceu a oportunidade do uso da imunistoquímica para detecção destes receptores esteróides. Esta técnica tem vantagens quando comparada aos métodos bioquímicos, pois necessita de pequena quantidade de tecido para ser realizada; possibilita a caracterização histológica das células que contém atividade do receptor; permite o estudo retrospectivo do material (material mantido em blocos parafinados), maior

sensibilidade e especificidade ao teste uma vez que utiliza anticorpos primários associados a anticorpos secundários marcados, que amplificam a resposta (COCK; DUCATELLE; LOGGHE, 1997; SABINI; CHUMAS; MANN, 1992).

Traish et al., 1990¹ (apud DE COCK et al., 1997), provaram que anticorpos monoclonais produzidos com seqüência de aminoácidos idêntica aquelas expressas nos receptores de estrógeno humanos, reagem com receptores estrogênicos de outras espécies, provando que este epítipo é conservado em muitas espécies. De Cock et al. (1997) demonstraram reação cruzada dos anticorpos anti-receptores de estrógeno humano com o receptor de estrógeno canino, provando a possibilidade da utilização dos “kits” comercialmente disponíveis para a detecção dos receptores em tecidos de cães (DE COCK et al., 1997; VERMEIRSCH et al., 1999; VERMEIRSCH et al., 2000).

Nas diferentes espécies animais, como nos humanos, há uma distribuição fisiológica desses receptores no trato genital feminino em resposta aos hormônios esteróides circulantes (RE et al., 1995; VERMEIRSCH et al., 1999; VERMEIRSCH et al., 2000; WANG; ERIKSSON; SAHLIN, 2000).

Vermeirsch et al. (1999, 2000) avaliaram por imunoistoquímica a distribuição e concentração dos receptores de estrógeno e progesterona nas camadas celulares de cortes histológicos de tecido uterino de cadelas, relacionando a presença dos receptores com a influência dos hormônios esteróides circulantes. Observaram que sob ação estrogênica há aumento na expressão dos receptores esteróides e sob ação progestacional diminuição enquanto no anestro, estes receptores voltam a se expressar com maior intensidade, porém em menor quantidade que na fase estrogênica. Estas observações também foram relatadas por outros autores (DE

¹ TRAISH, A. M.; ETTINGER, R.; KIM, N.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Development and characterization of monoclonal antibodies to specific domain of human estrogen receptor. **Steroids**, v. 55, p. 196-208, 1990.

COCK; DUCATELLE; LOGGHE, 1997; DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1997; DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1999).

Clark et al. (1977) concluíram que a progesterona inibe os receptores de estrógeno, interferindo com a ligação estrógeno-receptor no núcleo da célula, reduzindo e modificando assim seus efeitos nos eventos mediados pelo núcleo. A progesterona também induz um aumento na 17 β -hidroxisteróide-desidrogenase, uma enzima que reduz a concentração de estradiol no receptor estrogênico, assim a capacidade do estrógeno em estimular a expressão do receptor é alterada ou reduzida (DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1997). Segundo Wilson et al. (1998), a progesterona não interfere com a ligação inicial do estrógeno ao seu receptor citosólico ou com a ligação nuclear do complexo receptor-estradiol e sim diminuindo os níveis do receptor de estrógeno citosólico através de mecanismos de desfosforilação- inativação. Em ratas, após administração continuada de estrógeno, a progesterona causa uma redução temporária nos complexos nucleares de receptor-estrógeno, seguido de um retorno aos níveis elevados (WILSON et al., 1998).

A progesterona além de inibir os receptores de estrógeno, também causa depleção dos seus receptores diminuindo os genes de transcrição de receptores de progesterona, aliado ao fato de que o RNAm para receptor de progesterona tem meia vida curta, contribuindo ainda mais para a queda dos níveis do receptor (WILSON et al., 1998).

Acredita-se também que o estrógeno seja fundamental na sensibilização do útero, sendo ele responsável pelo “priming” para estímulo da síntese de receptores de progesterona, aumentando desse modo a capacidade do útero em responder a progesterona (WILSON et al., 1998). Em estudos realizados em ratas, avaliou-se a

expressão dos receptores de progesterona em ratas ovariectomizadas e tratadas com estrógeno. As ratas ovariectomizadas apresentam baixa concentração de receptores de progesterona no tecido uterino e ausentes no tecido vaginal. No entanto, as ratas tratadas previamente com estrógeno, mostraram positividade maior em tecido uterino e presença dos receptores de progesterona em todas as camadas do tecido vaginal (UOTINEM et al., 1999), evidenciando-se a necessidade do “priming” estrogênico na expressão dos receptores de progesterona.

Porém, as ações regulatória e estimulatória dos hormônios, nem sempre são observadas nos tecidos do trato genital feminino tanto de humanos como nas diferentes espécies animais.

Em humanos os receptores de estrógeno e progesterona são encontrados no útero, cérvix, vagina e vulva, apresentando distribuição fisiológica nas diferentes fases do ciclo menstrual e também na menopausa (SCHWARTZ, 2000; WOLF; WANDT; JONAT, 1991). Segundo Wolf et al. (1991), na vagina, os receptores estrogênicos são encontrados em todas as camadas de células epiteliais, exceto na camada superficial; enquanto os receptores de progesterona só se expressam no tecido subepitelial. Nas mulheres pós-menopausa e sem reposição hormonal os receptores de estrógeno são significativamente mais elevados do que os receptores de progesterona. Schwartz (2000) demonstrou não haver diferença significativa nas concentrações de receptores de estrógeno entre as fases folicular e lútea de mulheres em ciclo regular e em mulheres pós-menopausa.

Em éguas a avaliação bioquímica da concentração dos receptores de estrógeno nos diferentes tecidos do trato genital (útero, cérvix e vagina), não apresentou diferença estatística significativa entre a fase folicular (ação estrogênica) e fase lútea (ação progestacional); porém os receptores de progesterona

apresentaram concentração significativamente maior na fase folicular do que na fase lútea, confirmando o efeito inibitório da progesterona sobre os receptores estrogênicos e o efeito estimulatório do estrógeno. Os cornos uterinos apresentaram uma concentração significativamente maior de receptores quando comparados com vagina e cérvix (RE et al., 1995).

Em vacas, estudo imunoistoquímico avaliando a concentração de receptores de estrógeno e progesterona na cérvix, não revelou diferença estatística quando comparados dois grupos: um com baixa concentração de progesterona sérica e outro grupo em fase lútea, colocando assim em dúvida os efeitos inibitórios da progesterona sobre os receptores (BREEVELD-DWARKASING et al.).

Vermeirsch et al. (2002) estudaram o comportamento dos receptores de estrógeno α (RE- α) e de progesterona na vagina e vulva de cadelas hígdas sendo o único relato encontrado na literatura. Notaram que os receptores estão localizados principalmente no núcleo das células do epitélio, no estroma e na musculatura lisa vaginal. Na vulva, pouca expressão dos receptores foi observada. Comparativamente a vagina expressa significativamente mais receptores do que a vulva, explicando em parte a resposta tecidual induzida pelos hormônios ser mais pronunciada na vagina. Durante o proestro e estro, quando as camadas epiteliais aumentam, os receptores aparecem principalmente na camada que contém células basais e parabasais. Para os RE- α no tecido vaginal, não houve mudança significativa durante o ciclo estral. Verificaram que a região do estroma normalmente apresenta coloração mais intensa do que a região epitelial, apesar de não ser estatisticamente significativa.

Ainda segundo Vermeirsch et al. (2002), a concentração dos receptores de progesterona na parede vaginal, não mostrou diferença estatisticamente significativa

durante o ciclo estral, apesar dos receptores estarem presentes nos vários tipos celulares.

O conhecimento da expressão fisiológica dos receptores esteróides nos diferentes tecidos alvo é de grande importância já que pode auxiliar no estudo de afecções que sofrem influência hormonal. Em humanos, vários estudos correlacionaram os tumores mamários e do sistema urogenital, com a presença de receptores esteróides (DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1999; RE et al., 1995; REICH et al., 2000,). Nas neoplasias genitais (sarcomas endometriais e angiomixoma vaginal), os receptores para progesterona aparecem em maior quantidade do que os de estrógeno nos tecidos classificados como benignos ou malignos bem diferenciados, e a resposta de cada tipo tumoral é diferente em relação aos hormônios (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000; REICH et al., 2000, SABINI; CHUMAS; MANN, 1992). O angiomixoma vaginal sob ação progestacional (na gestação), tende a crescer, porém responde bem a terapias com drogas anti-estrogênicas e inibidoras de GNRH (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000). Já os sarcomas endometriais apesar de apresentarem positividade para receptores de progesterona, estes mostraram diferentes padrões de comportamento em cada indivíduo. Portanto a terapia hormonal varia de acordo com a resposta obtida. A presença dos receptores esteróides pode tanto estimular o crescimento tumoral como inibir na presença do seu hormônio específico, mostrando a individualidade de cada tipo tumoral e a necessidade de estudos específicos para cada um (REICH et al., 2000; SABINI; CHUMAS; MANN, 1992). Nas neoplasias malignas ou pouco diferenciadas, os receptores geralmente estão ausentes ou são encontrados em concentrações baixas, indicando a importância da dosagem dos

receptores no prognóstico da doença (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000; REICH et al., 2000, SABINI; CHUMAS; MANN, 1992).

Nas cadelas, a correlação entre receptores de estrógeno, progesterona e afecções tumorais foram estudadas em tumores mamários e pouco se conhece a respeito do comportamento dos receptores hormonais nas neoplasias vaginais, ovarianas e uterinas.

2.2 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

O tumor venéreo transmissível (TVT), também chamado de Sarcoma ou Tumor de Sticker (MARCHAL et al., 1997), é uma neoplasia usualmente de natureza benigna, que acomete principalmente o trato genital masculino e feminino dos animais da espécie canina (VERMOOTEN, 1987). Não existe predisposição racial ou sexual para o TVT de ocorrência natural, porém parece ser mais comum em animais jovens, errantes e sexualmente ativos (VARASCHIN et al, 2001; ROGERS; WALKER; DILLON, 1998; VERMOOTEN, 1987). As pesquisas mais atuais sugerem que as fêmeas são mais acometidas que os machos devido ao seu comportamento durante o período de CIO, onde aceita vários machos e pela ação de hormônios na região genital garantindo um aporte de sangue maior associado a intumescência vulvar, favorecendo o transplante das células tumorais (SOBRAL; COSTA; CAMACHO, 1998).

A transmissão ocorre por meio do coito ou lambedura, pela deposição de células tumorais intactas em superfícies epiteliais que tenham sofrido injúria

(HARMELIN; ZUCKERMAN; NYSKA, 1995; MARCHAL et al., 1997; MOZOS et al., 1996), fato demonstrado pela primeira vez por Novinski² (apud VERMOOTEN, 1987), que transplantou células íntegras e viáveis de um hospedeiro para outro com sucesso. A participação de partículas virais na transmissão embora sugerida, nunca foi comprovada (AMBER; ISITOR; ADEYANJU, 1985; HILL; YANG; WACHTEL, 1984).

As lesões genitais externas são mais comuns porque o coito é traumático e acaba provocando ferimentos na mucosa vaginal ou peniana facilitando a implantação das células tumorais (VERMOOTEN, 1987). As metástases são raras, podendo ocorrer em animais imunossuprimidos e filhotes (HARMELIN; ZUCKERMAN; NYSKA, 1995; HILL; YANG; WACHTEL, 1984; VERMOOTEN, 1987,). Os tecidos mais comumente atingidos por metástases são linfonodos, pele, mucosa bucal e nasal (MOZOS et al., 1996) e com menor frequência, olhos, cérebro (HARMELIN; ZUCKERMAN; NYSKA, 1995), baço, fígado, pulmão, rins, pâncreas, testículos e linfonodos mesentéricos (MOZOS et al., 1996; ROGERS; WALKER; DILLON, 1998). Regressão espontânea ocorre nos casos induzidos experimentalmente, mas não existe informações sobre a frequência de regressão espontânea no tumor de ocorrência natural (VERMOOTEN, 1987).

Os sinais clínicos observados em machos e fêmeas incluem lambertura da genitália externa, secreção vaginal e prepucial sanguinolentas associada ao crescimento de massas tumorais (VARASCHIN et al., 2001), formada por um ou múltiplos nódulos de formato irregular, friável e de aspecto pedunculado, multilobulado ou em forma de “couve-flor” (VERMOOTEN, 1987). Nas cadelas os principais sítios de implantação do tumor são vagina, vestíbulo e junção vestíbulo

² Autora citada por VERMOOTEN (1987), porém referência não consta no artigo.

vaginal; e nos machos pode acometer a mucosa peniana e o prepúcio, mas acomete principalmente a região posterior ao bulbo (VARASCHIN et al., 2001).

O tipo celular presente no TVT é bastante controverso (HILL; YANG; WACHTEL, 1984; MOZOS et al., 1996). Histologicamente é um tumor de células redondas sendo descrito como endotelioma, linfossarcoma, reticulo-sarcoma, neuroblastoma, histiocitoma ou células maduras de origem retículo-endotelial (VERMOOTEN, 1987) entretanto, estudos imunofenotípicos recentes sugerem que possa ter origem de células histiocitárias (GONZALEZ et al., 2000; HASLER; WEBER, 2000; MOZOS et al., 1996).

A regressão espontânea do tumor pode ocorrer em inoculações experimentais (VERMOOTEN, 1987) e animais tratados e recuperados podem adquirir imunidade humoral e celular (MOZOS et al., 1996). Embora a resposta ao tratamento quimioterápico seja satisfatória, o comportamento biológico do TVT é variável e depende da resposta imune do hospedeiro (MOZOS et al., 1996).

Inicialmente, o tratamento preconizado para o tumor venéreo transmissível foi a extirpação cirúrgica (MACAFEE; MACAFEE, 1977) entretanto, o grau de recorrência do tumor após tratamento cirúrgico é de 17-58%, comparado com 0,05% de recorrência depois de tratamento com quimioterápicos (AMBER; ISITOR; ADEYANJU, 1985) por isso o tratamento quimioterápico tem sido o de escolha, sendo que a melhor resposta ocorre com o sulfato de vincristina (AMBER; ISITOR; ADEYANJU, 1985; GONZALEZ et al., 2000). Outros tratamentos também podem ser utilizados como a radioterapia, criocirurgia, vacinas autógenas e imunoterapia (GONZALEZ et al., 2000; VERMOOTEN, 1987). Apesar do tratamento quimioterápico ser eficaz, relatos de resistência ao tratamento já foram descritos (BUENO et al., 2003; ROGERS; WALKER; DILLON, 1998).

Bueno et al. (2003) em estudo retrospectivo realizado no Serviço de Obstetrícia e Ginecologia da Universidade de São Paulo entre 1996 a 2002, verificaram que dos 341 casos atendidos de TVT, 39% foram tratados e curados com quimioterapia, 55% não levaram o tratamento até o final e 18% apresentaram resistência a quimioterapia, sendo a resolução final o tratamento cirúrgico. Isto mostra o aumento do aparecimento dos casos de resistência e da necessidade de novos estudos.

3.1 ANIMAIS

A amostragem foi composta por 58 fêmeas da espécie canina, com idade entre 1 e 8 anos, atendidas no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-USP), encaminhadas ao Serviço de Obstetrícia e Ginecologia deste mesmo hospital, com suspeita de tumor venéreo transmissível e para ovário-histerectomia de conveniência.

3.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO

Todo os animais foram submetidos a anamnese detalhada e exame físico. De cada animal foi realizado hemograma completo e citologia vaginal (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001) para auxiliar na classificação do período do ciclo estral em que se encontravam. De algumas cadelas foi realizada também dosagem prévia de progesterona, para melhor direcionamento do período da cirurgia. Após todos os procedimentos os animais foram divididos em dois grupos:

- grupo experimental (GE): composto pelas cadelas com suspeita de TVT
- grupo controle (GC): composto pelas cadelas híginas

Foram excluídos do projeto animais com histórico prévio de tratamentos com quimioterápicos ou hormônios.

3.3 CONFIRMAÇÃO DO DIAGNÓSTICO

A confirmação do diagnóstico nas fêmeas portadoras de neoplasia foi realizada por citologia esfoliativa da massa tumoral vaginal. O material foi corado pelo método Panótico rápido e avaliado pelo tipo celular presente segundo critério descrito por Cowell et al. (1999). Do material tumoral colhido e fixado em formol tamponado a 10%, foram feitas lâminas que foram coradas com hematoxilina e eosina e posteriormente avaliadas no Departamento de Patologia da FMVZ-USP onde se confirmou o diagnóstico de TVT em todos os tecidos tumorais excisados.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para compor o GE, 37 animais foram submetidos à cirurgia para colheita de material, mas destes somente os fragmentos colhidos de 29 animais foram utilizados. As outras amostras foram excluídas devido a problemas com a fixação do material (máquina de blocagem) ou não apresentavam tecido epitelial íntegro ou o tecido estava invadido por células tumorais. O mesmo ocorreu no GC onde pelo menos três amostras foram excluídas devido à inviabilidade.

3.4.1 Colheita dos fragmentos

Todas as fêmeas foram submetidas à anestesia geral inalatória com Isoflurano para realização de ovário-histerectomia e colheita dos fragmentos. Antes de cada procedimento foi realizada novamente a citologia vaginal.

De cada animal foi colhida amostra do TVT (grupo experimental) e do tecido íntegro da parede lateral esquerda do vestíbulo vaginal (grupo controle e experimental), com auxílio de um “punch” de 6 mm. Estes fragmentos foram fixados em formol tamponado a 10%, e em 24 horas foram encaminhados ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo (Hospital do Câncer) para serem blocados em parafina e posteriormente serem utilizados para exames histopatológico e imunoistoquímico.

3.4.2 Colheita do sangue

De cada animal foi colhido 10 ml de sangue total da veia jugular, utilizando seringa plástica de 10 ml e agulha descartável (Becton e Dickinson B-D), que foi armazenado em tubo de vidro siliconizado com gel, sem anticoagulante e após alguns minutos centrifugados a 1500G por dez minutos. O soro obtido foi separado por aspiração com auxílio de pipeta plástica colocado em tubo plástico para congelamento, identificado e congelado a -20°C. Este soro foi utilizado para mensuração dos hormônios esteróides (estrógeno e progesterona).

3.4.3 Determinação dos hormônios esteróides no soro sanguíneo

As dosagens dos hormônios estrógeno e progesterona foram realizadas no Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, utilizando-se o soro colhido no período experimental.

Para dosagem de progesterona foi utilizado o KIT Coat-A-Count

Progesterone® da DPC-MedLab e para dosagem de 17β estradiol foi utilizado o KIT Third Generation Estradiol RIA DSL 39100 da Diagnostic System Laboratories, Inc.

No radioimunensaio em fase sólida a quantificação do antígeno é feita pela competição de formas radioativas e não radioativas de cada hormônio. Estes vão competir entre si pelos sítios de ligação livres no anticorpo específico. Neste sistema o anticorpo está ligado à parte interna dos tubos de polipropileno. O complexo antígeno-anticorpo permanece ligado à parede do tubo, e o antígeno livre é decantado ou evaporado. Os tubos são levados a um contador Gamma para determinação da quantidade de antígeno [125 I] ligado ao anticorpo. A quantidade de radiação detectada é inversamente proporcional à concentração do hormônio, que é por sua vez determinada através de curva padrão fornecida com o *Kit* comercial.

Os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos dos fornecedores e os seguintes parâmetros de controle de qualidade (QC) foram calculados: CPM total, capacidade de ligação, ligações não específicas (LNE), sensibilidade e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio e inter-ensaio.

3.4.4 Método empregado para avaliação da fase do ciclo estral

A fase do ciclo estral foi inicialmente estimada pela citologia vaginal (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001) e aspecto macroscópico dos ovários e posteriormente associada com a concentração de estrógeno e progesterona circulante (CONCANNON et al., 1989; VERMEIRSCH et al., 2002) e avaliação histológica do tecido vaginal. Dessa forma os animais foram incluídos nos grupos:

- GE: formado por 29 cadelas com TVT em estro, diestro e anestro
- GC: formado por 29 cadelas híginas proestro, estro, diestro e anestro

O GE não apresentou animais em proestro devido a dificuldade em atender animais com TVT que continuamente apresentavam sangramento e pela dificuldade de classificação inicial deste grupo apenas pela citologia vaginal e dosagem de progesterona.

3.4.5 Determinação dos receptores de estrógeno e progesterona (imunoistoquímica)

Com o auxílio de um micrótomo, cortes de aproximadamente 3-5µm foram feitos nos blocos de parafina que continham o material fixado. Estes pequenos cortes foram colocados em lâminas silanizadas (especiais para imunoistoquímica) e introduzidos na estufa para secagem e aderência do material a lâmina.

Inicialmente realizou-se a desparafinização do material por meio de banhos com xilol, lavagem com álcool e hidratação com água. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma panela de pressão elétrica e mantidas em temperatura de aproximadamente 120°C durante 15 minutos (após o início da pressão), numa solução de citrato com pH 6 com o objetivo de eliminar as pontes de metileno que se formam quando o material é fixado em formol tamponado (recuperação antigênica).

Após o aquecimento, as lâminas foram resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos. Para a fase de bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se peróxido de hidrogênio (água oxigenada) a 3%, realizando 3 banhos consecutivos de 5 minutos cada um. A seguir as lâminas foram lavadas em água corrente e então mantidas em leite Molico® a 3% durante 20 minutos, para bloqueio de proteínas interferentes.

A diluição do anticorpo primário foi feita em BSA (solução de albumina bovina) na concentração de 1:50 e colocado aproximadamente 100µl sobre a lâmina, incubando por 2 horas a temperatura ambiente em câmara úmida. Após lavagem em solução TSF (tampão salino fosfato), o material foi submetido ao anticorpo secundário biotilado durante 20 minutos a temperatura ambiente e nova lavagem com TSF.

Para amplificação da reação, foi utilizado o complexo estreptavidina peroxidase (Kit LSAB+ DAKO®) 100µl por 20 minutos e após lavagem com TSF foi acrescentado a diaminobenzidina (DAB- DAKO®) que é responsável pela revelação da reação e finalmente a contra coloração com a Hematoxilina de Harris durante 2 minutos, lavagem em água corrente, desidratação em álcool, diafanização e montagem com xilol.

Controles positivo e negativo foram realizados em cada procedimento. Para controle positivo e negativo foi utilizado fragmento de tumor mamário humano.

A avaliação da coloração dos receptores nas lâminas contendo tecido vaginal e tumoral foi realizada no Departamento de Patologia Animal através do programa Pró-Image Plus, usando microscópio ótico de luz com objetiva e aumento de 20 a 40x. Em cada lâmina um mínimo de 700 células foram avaliadas, levando em consideração apenas as células que faziam parte do epitélio vaginal, não considerando o estroma e células de musculatura lisa vaginal. Após a computação do percentual de núcleos positivos para cada lâmina foi dado um score proporcional de acordo com a tabela abaixo (VERMEIRSCH et al., 2002):

Tabela 1 – Score de graduação da coloração por Imunoistoquímica

SCORE PROPORCIONAL	
Score 0	Ausência de núcleos positivos
Score 1	< 1% de núcleos positivos
Score 2	1–9% de núcleos positivos
Score 3	10-32% de núcleos positivos
Score 4	33-65% de núcleos positivos
Score 5	> 65% de núcleos positivos

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS INSTITUTE, 2000).

Utilizando o aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Os que não obedeceram a estas premissas foram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e não havendo normalidade, empregou-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Para os dados que obedeceram as premissas, foi realizada a análise de variância paramétrica (PROC GLM / Teste de Tukey).

Para descrição dos resultados, foram empregados as médias e os erros padrão das médias (média $\pm$ erro padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através

da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram presença ou não de tumor (EXPERIMENTAL e CONTROLE) e fases do ciclo estral (anestro, proestro, estro e diestro). As variáveis respostas avaliadas foram concentrações plasmáticas de progesterona e estrógeno, escore dos receptores de progesterona e escore dos receptores de estrógeno.

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias presença de tumor (EXPERIMENTAL e CONTROLE), fase do ciclo estral (anestro, proestro, estro e diestro) e a interação entre as duas classes.

As variáveis resposta concentração plasmática de progesterona e concentração plasmática de estrógeno não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10.

As variáveis resposta escore dos receptores de progesterona e escore dos receptores de estrógeno, não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-los. Estas variáveis foram então analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do Teste de Kruskal Wallis para verificar o efeito dos tratamentos e do teste de Wilcoxon/Tukey para comparação dois a dois.

Os resultados obtidos foram dispostos em tabelas, em função da média e erro padrão da média nos grupos experimental e controle; comparando-se na coluna as diferentes fases do ciclo estral em cada grupo e na linha a mesma fase do ciclo entre os grupos experimental e controle.

4.1 PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE DOS RADIOIMUNENSAIOS

Foram calculados os coeficientes de variação (CV) intra-ensaio e inter-ensaio para cada hormônio e a sensibilidade dos ensaios. Os resultados estão expressos nas quadros 1 e 2.

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	11581,8	40%	102,30	0,88%	93,4(0,11)	8,02%	7,04%
2	51713,3	53%	432,30	0,84%	88,1(0,4)	2,79%	3,36%
CV Inter ensaio						13,37%	2,13%

Quadro 1 – Parâmetros de controle de qualidade para as dosagens hormonais de 17β estradiol dos grupos experimental e controle. São Paulo, 2004

	CPM	Cap Lig.	L.N.E	L.N.E	Sensibilidade	CV Intra	CV Intra
Ensaio	total	B/B0	CPM	(%)	% (dose)	Baixo	Alto
1	39126,8	53%	187,30	0,48%	95,2(0,005)	13,14%	1,20%
2	28266,3	53%	252,30	0,89%	94,1(0,014)	0,07%	6,38%
CV Inter ensaio						5,31%	2,56%

Quadro 2 – Parâmetros de controle de qualidade para as dosagens hormonais de progesterona dos grupos experimental e controle. São Paulo, 2004

4.2 CONCENTRAÇÃO DOS HORMÔNIOS

Os resultados obtidos das concentrações séricas de 17β estradiol e progesterona estão expressos nas tabelas 2 e 3 respectivamente,

Tabela 2 – Concentração sérica média de 17β estradiol em pg/ml das cadelas (n) dos grupos experimental e controle nas fases do ciclo estral. São Paulo, 2004

FASES	n	EXPERIMENTAL	n	CONTROLE	p
Anestro	16	6.27 ± 1.24^c	7	9.24 ± 3.20^{bc}	0,4198
Proestro	0	-	7	48.17 ± 8.68^a	-
Estro	5	18.13 ± 5.02^{abc}	5	31.31 ± 5.74^{ab}	0,7311
Diestro	8	10.00 ± 1.65^{bc}	10	13.38 ± 2.17^{abc}	0,2947

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

p= significância estatística entre os grupos na mesma fase

Tabela 3 – Concentração sérica média de progesterona em ng/ml das cadelas (n) dos grupos experimental e controle nas fases do ciclo estral. São Paulo, 2004

FASES	n	EXPERIMENTAL	n	CONTROLE	p
Anestro	16	0.44 ± 0.11^a	7	0.43 ± 0.15^a	0,6930
Proestro	0	-	7	0.67 ± 0.17^a	-
Estro	5	2.69 ± 0.77^b	5	4.60 ± 1.08^b	0,1699
Diestro	8	21.30 ± 3.80^c	10	27.24 ± 3.05^c	0,2012

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)
p= significância estatística entre os grupos na mesma fase

4.3 LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES

Apesar de o foco de interesse ser apenas o epitélio vaginal, em 100% das lâminas consideradas positivas, as células do estroma também apresentaram positividade e esta positividade em todas as camadas foi ao nível nuclear. Os receptores tanto de estrógeno quanto de progesterona são encontrados principalmente nas células das camadas basal e parabasal, fato evidenciado principalmente nos períodos de estro e proestro onde o número de camadas celulares é múltiplo.

4.4 IMUNOISTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE ESTRÓGENO α (RE- α) NO TECIDO VAGINAL E TUMORAL

Tabela 4 – Média e erro padrão da média dos scores proporcionais dos RE- α no epitélio vaginal das cadelas (n) dos grupos experimental e controle nas fases do ciclo estral. São Paulo, 2004

FASES	n	EXPERIMENTAL (0-5)	n	CONTROLE (0-5)	p
Anestro	16	2.50 ± 0.53^{bc}	7	3.43 ± 0.20^{ab}	0,3258
Proestro	0	-	7	3.57 ± 0.62^{ab}	-
Estro	5	1.20 ± 0.73^c	5	3.60 ± 0.98^a	0,0485
Diestro	8	3.88 ± 0.59^{ab}	10	1.10 ± 0.56^c	0,0029

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

p= significância estatística entre os grupos na mesma fase

Os animais do GC expressaram os RE- α significativamente maior nas fases anestro, proestro (Figura 1) e estro quando comparadas com a fase diestro. Já entre o anestro, proestro e estro, não houve diferença significativa.

Para os animais do GE houve diferença significativa na expressão dos RE- α nas fases estro e diestro, sendo a expressão maior no diestro (Figura 3). Porém comparando diestro e anestro, apesar de o diestro possuir maior quantidade de receptores, não houve diferença estatística significativa.

Quando comparou-se a expressão dos RE- α entre as mesmas fases do ciclo nos diferentes grupos (GE e GC), percebeu-se diferença estatística entre os períodos diestro e estro. No GC houve expressão de quantidade maior de RE- α na fase estro e no GE a concentração foi maior no diestro.

No tumor venéreo transmissível, não houve positividade em nenhuma das lâminas observadas (Figura 4), mas como mostra a figura 7 e 8; pode-se notar íntima relação entre as células tumorais e as células do estroma vaginal que tem alta

positividade para os RE- α . Além disso, o estroma também mostrou positividade para RE- α no endotélio de vasos sanguíneos (Figura 7).

4.5 IMUNOÍSTOQUÍMICA PARA RECEPTORES DE PROGESTERONA (RP₄) NO TECIDO VAGINAL E TUMORAL

Durante o ciclo estral não se observou diferença estatística significativa na expressão dos RP₄ entre os animais do grupo controle, sendo a distribuição entre as fases homogênea (Figura 2).

Para os animais do grupo experimental, não se observou expressão dos RP₄ em nenhuma das fases nos fragmentos avaliados (Figura 5). O tumor venéreo transmissível também não mostrou positividade para esse receptor.

Tabela 5 – Média e erro padrão da média dos scores proporcionais de RP₄ no epitélio vaginal das cadelas dos grupos experimental e controle nas fases do ciclo estral. São Paulo, 2004

FASES	n	EXPERIMENTAL	n	CONTROLE
Anestro	16	0 ^a	7	0.85 ± 0.60 ^a
Proestro	0	-	7	0.57 ± 0.57 ^a
Estro	5	0 ^a	5	0.60 ± 0.60 ^a
Diestro	8	0 ^a	10	0.40 ± 0.40 ^a

^{a,b,c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

O gráfico abaixo ilustra a comparação nos grupos entre as diferentes fases do ciclo estral e a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona.

Gráfico 3 - Média dos scores proporcionais de RP4 e RE- α no epitélio vaginal das cadelas dos grupos experimental e controle nas fases do ciclo estral.

Figura 1 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo controle em proestro, mostrando a distribuição dos RE- α por imunistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 2 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo controle em diestro, mostrando a distribuição dos RP₄ por imunistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 3 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo experimental em diestro, mostrando a distribuição dos RE- α por imunoistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 4 - Fotomicrografia do fragmento vaginal de cadela do grupo experimental em diestro, mostrando resultado negativo para RE- α por imunoistoquímica em epitélio (A), estroma (B) e TVT (C) (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 5 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo experimental em diestro, mostrando resultado negativo para RP₄ por imunoistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 6 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo controle em diestro, mostrando resultado negativo para RP₄ por imunoistoquímica (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 7 - Fotomicrografia de fragmento vaginal de cadela do grupo experimental em estro, mostrando resultado positivo para RE- α por imunoistoquímica em epitélio (A), estroma (B) e vaso sangüíneo (C) (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

Figura 8 - Fotomicrografia do epitélio vaginal de cadela do grupo experimental em estro, mostrando resultado positivo para RE- α por imunoistoquímica em estroma e vasos sangüíneos (A) e negativo para células de TVT (B) (estreptavidina-biotina-peroxidase + hematoxilina obj 20X)

A avaliação imunoistoquímica dos receptores esteróides no trato genital feminino, apesar de ser amplamente estudado em humanos, na espécie canina ainda é recente e com poucos trabalhos publicados. Porém no estudo das afecções tumorais de tecido vaginal em cadelas não há relatos em literatura, apesar de observações da rotina clínica sugerirem estreita relação da maioria dos tumores com as alterações hormonais do ciclo estral principalmente nos períodos de ação estrogênica. A escolha do tumor venéreo transmissível como base deste estudo, levou em consideração o fato de que é um dos tumores de maior casuística na espécie canina além dos problemas com desenvolvimento de resistência citados anteriormente.

5.1 TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL

O TVT atualmente é uma das mais freqüentes afecções tumorais que acometem os animais da espécie canina, principalmente no Brasil. Em concordância aos relatos de literatura (ROGERS; WALKER; DILLON, 1998; VARASCHIN et al., 2001; VERMOOTEN, 1987), a maioria dos animais atendidos apresentavam idade entre 1 e 8 anos em média e livre acesso à rua.

O número de animais errantes ainda é muito alto e a pouca conscientização dos proprietários em relação a programas de controle de natalidade facilitam a disseminação do problema. O Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do HOVET-USP atualmente atende em média 50 casos de TVT por ano (BUENO et al., 2003), dados apenas das fêmeas. Trata-se de uma afecção de alta freqüência no país, em

comparação a trabalhos estrangeiros, nos quais o levantamento de 12 anos de estudo apresentou apenas 29 casos (ROGERS; WALKER; DILLON, 1998).

As características clínicas descritas em literatura e as observadas nos animais do presente estudo são similares, como o sangramento vaginal persistente, a lambertura constante da região e o aparecimento de massas friáveis com aspecto de “couve-flor” em região de genitália.

Para o diagnóstico do TVT, a citologia esfoliativa tumoral mostrou-se ser eficaz pois 100% dos casos suspeitos foram confirmados pelo exame histopatológico. Dos animais encaminhados e triados para o presente estudo (mais de 60) apenas um apresentava características clínicas sugestivas de TVT, mas não havia histórico clínico de cruzamento e a avaliação por citologia esfoliativa revelou tratar-se de mastocitoma. Isto indica o quanto as características do TVT são peculiares.

O tratamento quimioterápico com o sulfato de vincristina ainda é o de escolha. Não obstante os bons resultados, a falha nas aplicações (ausência dos proprietários) ou a interrupção temporária do tratamento devido a alterações hematológicas (linfopenia), podem resultar em resistência à quimioterapia. Nos últimos anos, os casos de resistência quimioterápica aumentaram significativamente (BUENO et al., 2003).

Para identificar as fases do ciclo estral nos animais do GE, a citologia vaginal esfoliativa muitas vezes foi inconclusiva, devido ao desconhecimento do proprietário sobre o histórico reprodutivo do animal e o exame citológico mostrar grande quantidade de células de TVT, hemáceas e raras células de epitélio vaginal.

Em alguns casos a dosagem de progesterona foi feita como método de triagem, mas não permitiu diferenciar o anestro do proestro, quando as concentrações de progesterona são basais.

O GE não apresentou animais em fase de proestro, pela dificuldade encontrada pelo proprietário em identificar o cio, devido ao sangramento incessante, decorrente do TVT. Outros proprietários mostraram urgência na resolução do problema, portanto esperar o início do cio nesses animais foi inviável. Dos poucos proprietários que se dispuseram a esperar o aparecimento dos sinais de cio como colaboração ao presente estudo, muitos desistiram e não retornaram. Portanto, tal indicação poderia comprometer a adesão do proprietário ao experimento.

Outra possibilidade para formar o grupo experimental seria a indução do TVT nesses animais, porém a implantação experimental não tem as mesmas características do TVT transmitido por vias naturais. A regressão espontânea citada por autores (VERMOOTEN, 1987) não é comumente observada na rotina clínica.

5.2 LOCALIZAÇÃO DOS RECEPTORES

A localização dos RE- α e RP₄ foi nuclear e observada em células basais e parabasais, dados semelhantes aos encontrados por Vermeirsch et al. (2002). Apesar do foco principal deste estudo ser a expressão dos receptores no epitélio vaginal, foi evidente a presença dos receptores no estroma vaginal. Quando o resultado era positivo para o epitélio, também o era para o estroma.

Algumas lâminas mostraram resultado negativo para RE- α no epitélio, porém o estroma apresentou positividade. Não foi possível avaliar a presença de receptores no tecido muscular devido a ausência do tecido nas amostras colhidas.

5.3 IMUNOISTOQUÍMICA DOS RE- α NO EPITÉLIO VAGINAL DO GRUPO EXPERIMENTAL E CONTROLE

A técnica de imunoistoquímica utilizada neste projeto não foi exatamente igual a usada por Vermeirsch et al. (2002). Para fixação do material para avaliação dos RE- α Vermeirsch et al. (2002) utilizaram formol não-tamponado a 3,5% com pH em 3,6 enquanto neste estudo utilizou-se formol tamponado a 10% com pH entre 7,2 e 7,4. Apesar das diferenças, não houve interferência com a coloração dos RE- α , os quais apresentaram nítida positividade.

Os resultados dos RE- α no GC do presente experimento, diferem dos resultados obtidos por Vermeirsch et al. (2002), pois estes não observaram diferença estatística na expressão dos RE- α na vagina durante as fases do ciclo estral. Entretanto os resultados encontrados neste estudo são semelhantes aos obtidos por Vermeirsch et al. (1999) para o tecido uterino de cadelas, no qual demonstra claramente o efeito estimulatório do estrógeno e inibitório da progesterona sobre os RE- α , fato também observado por outros autores em cadelas (DE COCK; DUCATELLE; LOGGHE, 1997; DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1997; DHALIWAL; ENGLAND; NOAKES, 1999).

Fisiologicamente a vagina sofre modificações em sua estrutura nas diferentes fases do ciclo estral, aumentando em volume e vascularização no período de

proestro, quando as concentrações de 17β estradiol estão elevadas. Neste período espera-se que haja maior expressão dos RE- α , como foi confirmado neste estudo. Posteriormente, mesmo com a diminuição da concentração sérica do 17β estradiol, a expressão dos RE- α manteve-se, diminuindo somente no diestro, período no qual a progesterona atua inibindo sua expressão.

Devemos salientar que os fragmentos colhidos dos animais deste experimento foram todos de vestibulo vaginal onde as alterações normalmente são mais expressivas (observação pessoal), enquanto Vermeirsch et al. (2002) colheram os fragmentos de vagina cranial o que poderia explicar as diferenças entre os resultados obtidos.

Em trabalhos realizados com outras espécies animais (RE et al, 1995) e em humanos (SCHWARTZ, 2000; WOLF; WANDT; JONAT, 1991), não foram notadas diferenças na expressão dos dois receptores nas diferentes fases do ciclo. Verificaram que havia ligeira diminuição na expressão dos receptores no período gestacional, fato igualmente observado nas cadelas deste estudo.

O GE apresentou um padrão de positividade para RE- α diferente do esperado em relação ao GC. Na vagina de cadelas com TVT durante o estro houve diminuição significativa dos RE- α , quando o esperado seria um aumento, conforme obtido no GC. Fato semelhante ocorreu no diestro quando houve evidente expressão dos RE- α , pois o esperado seria uma diminuição. Quando se comparou os animais em estro dos dois grupos, a diferença estatística encontrada ($p=0,049$) não permitiu afirmar que houve inibição da expressão dos RE- α nesta fase. Esse resultado talvez tenha sido afetado pelo número pequeno de animais nos grupos avaliados. Durante o estro, as concentrações de progesterona começam a se elevar, exercendo sua ação

inibitória sobre os RE- α . Nota-se que no GE este mecanismo inibitório não ocorreu pois no diestro houve aumento significativo dos RE- α no GE em relação ao GC ($p=0,029$).

Apesar do TVT não expressar receptores para estrógeno e progesterona, isso não impede o tumor, por mecanismos diversos, promover alguma alteração que possa justificar essa mudança no padrão de expressão dos RE- α no epitélio vaginal. Como citado por Wilson et al. (1998), alguns fatores de crescimento, como o EGF podem estimular a transcrição dos genes para receptor de estrógeno por vias alternativas e independentes, sendo uma delas por meio de seus próprios receptores de membrana. Isso pode sugerir a presença de possíveis fatores de crescimento tumorais (como o fator de crescimento transformador, ou fatores estimuladores de crescimento endotelial) produzidos pelo TVT, serem os responsáveis pela maior expressão dos RE- α no período progestacional (diestro).

A maior expressão dos RE- α poderia facilitar a ação do estrógeno sérico basal neste período, mantendo a vagina com maior vascularização pois favorece o aporte nutricional e o desenvolvimento tumoral. A presença do RE- α no epitélio e estroma vaginal de cadelas portadoras de TVT e ainda na parede dos vasos sangüíneos do próprio estroma poderiam ser um fator facilitador para o crescimento tumoral.

5.4 IMUNOISTOQUÍMICA DOS RP₄ NO EPITÉLIO VAGINAL DO GRUPO EXPERIMENTAL E CONTROLE

Os resultados obtidos neste estudo para os RP₄ não foram expressivos como

os obtidos por Vermeirsch et al. (2002) na vagina de cadelas híginas. A expressão dos RP₄ nas cadelas do GC, não apresentaram diferença estatística entre as fases do ciclo estral, dados concordantes com os obtidos por Vermeirsch et al. (2002); entretanto a coloração apresentada para os RP₄ não foi tão intensa e evidente quanto a encontrada para os RE- α . Ressalte-se que a técnica utilizada neste experimento foi diferente da usada pelo referido autor, o que poderia explicar a baixa positividade.

A técnica selecionada no delineamento experimental seguiu a de rotina do Hospital A.C. Camargo para humanos onde os fragmentos colhidos são fixados em formol tamponado a 10%, com pH: 7,2-7,4, enquanto Vermeirsch et al. (2002) utilizou formol tamponado a 3,5% com pH: 6,7. Provavelmente a porcentagem do formaldeído utilizada neste projeto possa não ser apropriada para determinar os RP₄ em cães.

Um dado que deve ser considerado é que o epitélio vaginal de cadelas portadoras de TVT não apresentou resultado positivo ou fracamente positivo para os RP₄, o que permite supor que talvez seja mais um mecanismo mediado pelo tumor para facilitar o seu desenvolvimento.

5.5 IMUNOISTOQUÍMICA DOS RE- α E RP₄ NO TVT

Apesar de vários estudos em humanos demonstrarem a presença de receptores esteróides em tumores do aparelho genital e diferentes respostas às terapias hormonais instituídas (MCCLUGGAGE; PATTERSON; MAXWELL, 2000;

REICH et al, 2000; SABINI; CHUMAS; MANN, 1992), o TVT não apresentou positividade para os receptores estudados.

O conceito normalmente descrito para tumor ou neoplasia é que se forma a partir de células que sofrem mutação ou diferenciação levando ao crescimento celular exacerbado e incontrolável. Quando o tecido normal expressa receptores, espera-se que o tecido tumoral também expresse, porém com suas individualidades. O TVT não é um tumor originário de células vaginais mutantes ou indiferenciadas e sim um tumor transmissível pela deposição de células tumorais existentes em um tecido acometido para um tecido lesado, característica essa que o torna único. Isto poderia explicar em parte a ausência dos receptores. Outra explicação possível seria que o TVT durante o seu crescimento leva a destruição do epitélio vaginal e nesse caso, os receptores poderiam ser destruídos também.

A ausência dos receptores para estrógeno e progesterona no TVT não refuta a idéia de hormonioterapia associada ao TVT. Mas para isso novos estudos devem ser conduzidos visando averiguar as causas que levam a alteração na expressão dos RE- α e RP₄ observadas na vagina de cadelas acometidas pelo TVT, para posteriormente avaliar o possível emprego da hormonioterapia como tratamento adjuvante.

Diferente de humanos, na medicina veterinária a possibilidade da ovário-histerectomia é um fator que deve ser questionado, pois pode trazer benefícios para o tratamento do TVT, por diminuir os efeitos das alterações fisiológicas hormonais que poderiam interferir com o tratamento quimioterápico.

- 1) O epitélio vaginal de cadelas híginas expressa RE- α e RP₄ enquanto o das cadelas portadoras de TVT expressam apenas RE- α .
- 2) Cadelas híginas expressam maior quantidade de RE- α no período de anestro, proestro e estro em relação ao diestro. A expressão dos RP₄ não foi significativa nas diferentes fases do ciclo. Cadelas com TVT mostraram maior expressão de RE- α no diestro quando comparado ao estro.
- 3) Não houve expressão dos RE- α e RP₄ no TVT nas fases analisadas.
- 4) A expressão de RE- α foi maior no estro das cadelas híginas e no diestro das cadelas portadoras de TVT.

7 – Considerações Finais

Embora não tenham sido incluídos no grupo deste estudo todos os animais triados para o Serviço de Obstetrícia, estes foram atendidos, submetidos a ovário-histerectomia e tratados até receberem alta. Alguns dados interessantes puderam ser observados neste período como a diminuição do tumor no pós-operatório imediato; a média de aplicações de quimioterápico (sulfato de vincristina) nos animais castrados previamente foi de 4 aplicações; esquema semelhante realizado por Bueno et al. (2003) em apenas 44% das fêmeas não castradas em período experimental de 6 anos. No presente estudo, de todas as cadelas atendidas apenas uma apresentou resistência tendo que ser submetida a tratamento cirúrgico para excisão do tumor.

A diminuição do tumor no período pós operatório imediato pode ser um forte indício da relação dos hormônios sexuais com o crescimento tumoral, associado aos dados encontrados neste experimento. A ovário-histerectomia pode ser importante aliada ao tratamento quimioterápico, por ajudar a regressão parcial do tumor, melhorar a atuação do quimioterápico e diminuir o tempo de exposição do animal à droga.

Com base nas presentes observações, nota-se a importante necessidade de futuros estudos com o objetivo de melhor compreender a participação dos hormônios sexuais no desenvolvimento tumoral.

REFERÊNCIAS

ALLEN, J. D.; BRINKHUIS, R. F.; VAN DEEMTER, L.; WIJNHOLDS, J.; SCHINKEL A. H. Extensive contribution of the multidrug transporters p-glycoprotein and Mrp1 to basal drug resistance. **Cancer Research**, v. 60, n. 20, p. 5761-5766, 2000.

AMBER, E. I.; HENDERSON, R. A.; ADEYANJU, J. B.; GYANG, E. O. Single-drug chemotherapy of canine transmissible venereal tumor with cyclophosphamide, methotrexate or vincristine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 6, n. 5, p. 144-147, 1992.

AMBER, E. I.; ISITOR, G. N.; ADEYANJU, J. B. Viral-like particles associate with naturally occurring transmissible venereal tumor in two dogs: preliminary report. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 12, p. 2613-2615, 1985.

BERGMAN, P. J.; OGILVIE, G. K. Drug resistance and cancer therapy. **The Compendium of Continuing Education**, v. 17, n. 4, p. 549-556, 1995.

BREEVELD-DWARKASING, V. N. A.; BOER-BROUWER, M.; SOEDE, N. M.; WEIJDEN, G. C.; TAVERNE, M. A. M.; DISSET-EMILIANI, F. M. F. **Immunohistochemical distribution of oestrogen and progesterone receptors and tissue concentrations of oestrogen in the cervix of non-pregnant cows.** Disponível em: <<http://www.library.uu.nl>>. Acesso em: 15 jan. 2004.

BUENO, M. G.; BRITO, C. P.; HAIPEK, K.; OLIVEIRA, C. M. Análise retrospectiva do tumor venéreo transmissível (TVT) em cadelas, durante os anos de 1996 a 2002. Avaliação da resposta ao tratamento quimioterápico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 214, 2003. Suplemento.

CALVERT, C. A.; LEIFER, C. E.; MACEWEN, E. G. Vincristine for treatment of transmissible venereal tumor in the dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**; v. 181, n. 2, p. 163-164, 1982.

CONCANNON, P. W.; MCCANN, J. P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 39, p. 3-25, 1989. Supplement.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; MEINKOTH, J. H. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat.** 2. ed. St Louis: Mosby, 1999. 338 p.

DE COCK, H.; DUCATELLE, R.; LOGGHE, J. P. Immunohistochemical localization of estrogen receptor in the normal canine female genital tract. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 3, p. 133-147, 1997.

- DE COCK, H.; VERMEIRSCH, H.; DUCATELLE, R.; SCHEPPER, J. Immunohistochemical analysis of estrogen receptors in cystic-endometritis-pyometra complex in the bitch. **Theriogenology**, v. 48, p. 1035-1047, 1997.
- DHALIWAL, G. K.; ENGLAND G. C. W.; NOAKES D. E. Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch oestrus and metoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 51, p. 167-170, 1997. Supplement.
- DHALIWAL, G. K.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E. The influence of exogenous steroid hormones on steroid receptors, uterine histological structure and the bacterial flora of the normal bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 56, p. 259-277, 1999.
- DONNAY, I.; RAUIS, J.; DEVLEESCHOUWER, N.; WOUTERS-BALLMAN, P.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Comparison of estrogen and progesterone receptor expression in normal and tumor mammary tissues from dogs. **American Journal Veterinary Research**, v. 56, n. 9, p. 1188-1194, 1995.
- DONNAY, I.; WOUTERS-BALLMAN, P.; DEVLEESCHOUWER, N.; LECLERCQ, G.; VERSTEGEN, J. Changes in oestrogen, progesterone and epidermal growth factor receptor concentrations and affinities during the oestrous cycle in the normal mammary gland and uterus of dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 191, n. 2, p. 101-113, 1996.
- GONZALEZ, M. C.; GRIFFEY, S. M.; NAYDAN, D. K.; FLORES, E.; CEPEDA, R.; CATTANEO, G.; MADEWELL, B. R. Canine Transmissible Venereal Tumour: A morphological and immunohistochemical study of 11 tumours in growth phase and during regression after chemotherapy. **Journal of Comparative Pathology**, v. 122, p. 241-248, 2000.
- HARMELIN, A.; ZUCKERMAN, A.; NYSKA, A. Correlation of Ag-NOR protein measurements with prognosis in canine transmissible venereal tumour. **Journal of Comparative Pathology**, v. 112, p. 429-433, 1995.
- HASLER, A. H.; WEBER, W. T. Theriogenology question of the month. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 10, p. 1557-1559, 2000.
- HILL, D. L.; YANG, T. J.; WATCHEL, A. Canine transmissible venereal sarcoma: Tumor cell and infiltrating leukocyte ultrastructure at different growth stages. **Veterinary Pathology**, v. 21, p. 39-45, 1984.

JOHNSTON, S. D.; KIANG, D. T.; SEGUIN, B. E.; HEGSTAD, R. L. Cytoplasmic estrogen and progesterone receptors in canine endometrium during the estrous cycle. **American Journal Veterinary Research**, v. 46, n. 8, p. 1653-1658, 1985.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. 592 p.

MARCHAL, T.; CHABANNE, L.; KAPLANSKI, C.; RIGAL, D.; MAGNOL, J. P. Immunophenotype of the canine transmissible venereal tumour. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1-2, p. 1-11, 1997.

MACAFEE, L. T.; MACAFEE J. T.; Transmissible Venereal Tumor: surgery and chemotherapy (case report). **Veterinary Medicine Small Animal Clinician**; v. 72, n. 2, p. 199-203, 1977.

MCCLUGGAGE, W. G.; PATTERSON, A.; MAXWELL, P. Aggressive angiomyxoma of pelvic parts exhibits oestrogen and progesterone receptor positive. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 603-605, 2000.

MOZOS, E.; MÉNDEZ, A.; GÓMEZ-VILLAMANDOS J. C.; MARTIN, M. J.; PÉREZ, J. Immunohistochemical characterization of canine transmissible venereal tumor. **Veterinary Pathology**, v. 33, p. 257-263, 1996.

OLSON, P. N.; BOWEN, R. A.; BEHRENDT, M. D.; OLSON, J. D.; NETT, T. M. Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1196-1206, 1982.

RE, G.; BADINO, P.; NOVELLI, A.; DI RENZO, G. F.; SEVERINO, L.; DE LIGUORO, M.; FERONE, M. R. Distribution of cytosolic oestrogen and progesterone receptors in the genital tract of the mare. **Research in Veterinary Science**, v. 59, p. 214-218, 1995.

REICH, O.; REGAUER, S.; URDL, W.; LAHOUSEN, M.; WINTER, R. Expression of oestrogen and progesterone receptor in low-grade endometrial stromal sarcomas. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 5, p. 1030-1034, 2000.

ROGERS, K. S.; WALKER, M. A.; DILLON, H. B. Transmissible venereal tumor: A retrospective study of 29 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, p. 463-470, 1998.

SABINI, G.; CHUMAS, J. C.; MANN, W.J. Steroid hormone receptors in endometrial stromal sarcomas. A biochemical and immunohistochemical study. **American Journal Clinical Pathology**, v. 97, n. 3, p. 381-386, 1992.

SAS Institute. **SAS user's guide: statistics**. Versão 5.0. Cary, 2000. 1 CD ROM

SCHWARTZ, P. E. The oestrogen receptor (ER) in vulva, vagina and ovary. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. S27-S36, 2000.

SOBRAL, R. A.; COSTA, M. T.; CAMACHO, A. A. Occurrence of canine transmissible venereal tumour in dogs from the Jaboticabal region, Brazil. **Ars Veterinária**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 1998.

UOTINEN, N.; PUUSTINEN, R.; PASANEN, S.; MANNINEN, T.; KIVINEVA, M.; SIVÄLÄ, R.; TUOHIMAA, P.; YLIKOMI, T. Distribution of progesterone receptor in female mouse tissue. **General and Comparative Endocrinology**, n. 115, p. 429-441, 1999.

VARASCHIN, M. S.; WOUTERS, F.; BERNIS, V. M. O.; SOARES, T. M. P.; TOKURA, V. N.; DIAS, M. P. L. L. Tumor venéreo transmissível canino na região de Alfenas, Minas Gerais: formas de apresentação clínico-patológicas. **Clínica Veterinária**, n. 32, p. 32-38, 2001.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; HELLEMANS, A.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 53, p. 773-788, 2000.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; LAUWERS, H.; CORYN, M. Immunohistochemical detection of estrogen receptors in the canine uterus and their relation to sex steroid hormone levels. **Theriogenology**, v. 51, p. 729-743, 1999.

VERMEIRSCH, H.; SIMOENS, P.; DEN BROECK, W. V. Immunolocalization of sex steroid hormone receptors in canine vaginal and vulvar tissue and their relation to sex steroid hormone concentrations. **Reproduction Fertility Development**, v. 14, p. 251-258, 2002.

VERMOOTEN, M. I. Canine transmissible venereal tumour (TVT): a review. **Journal of South African Veterinary Association**, v. 58, n. 3, p. 147-150, 1987.

WANG, H.; ERIKSSON, H.; SAHLIN, L. Estrogen receptors α and β in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1331-1340, 2000.

WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Williams textbook of endocrinology**. 9. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. 1819 p.

WOLF, H.; WANDT, H.; JONAT, W. Immunohistochemical evidence of estrogen and progesterone receptor in the female lower urinary tract and comparison with the vagina. **Gynecology Obstetrics Investigation**, v. 32, p. 227-231, 1991.