



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACEUTICAS

AVALIAÇÃO CITOLÓGICA EM BASE LÍQUIDA DE FÁRMACOS
MODULADORES ESTROGÊNICOS

RAND RANDALL MARTINS

Orientador: Prof^a Dr^a Telma Maria Araújo Moura Lemos

NATAL/RN

2006

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO CITOLÓGICA EM BASE LÍQUIDA DE FÁRMACOS
MODULADORES ESTROGÊNICOS

RAND RANDALL MARTINS

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em ciências Farmacêuticas como requisito para a obtenção do grau de MESTRE em ciências Farmacêuticas, área de concentração Bioanálises.

Orientador: Prof^a Dr^a Telma Maria Araújo Moura Lemos

NATAL/RN

2006

RAND RANDALL MARTINS

***AVALIAÇÃO CITOLÓGICA EM BASE LÍQUIDA DE FÁRMACOS
MODULADORES ESTROGÊNICOS***

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

**Prof^ª. Dr^ª. Telma Maria Araújo Moura Lemos
Orientadora**

**Prof^º. Dr^º. Carlos Eduardo Queiroz
Examinador externo**

**Prof^ª. Dr^ª. Ana Claudia Galvão Freire Gouveia
Examinador interno**

NATAL

2006

Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Setorial do CCS

Martins, Rand Randall

Avaliação citológica em base líquida de fármacos moduladores estrogênicos / Rand Randall Martins. – Natal, RN, 2006.
75 f.

Orientadora: Telma Maria de Araújo Moura Lemos

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacologia – Dissertação. 2 Inibidores da aromatase– Dissertação. 3. Combinação de medicamentos = Citologia – Dissertação. Martins, Rand Randall. II. Título.

RN/UF/BS-CCS

CDU 615 (043.3)

“Entia non sunt multiplicanda praeter necessitatem”

“Se existem duas hipóteses plausíveis para o mesmo fenômeno, a mais correta é também a mais simples.”
William de Ockham (1285 - 1349)

Agradecimentos

A Prof^a Dr^a Telma Maria Araújo Moura Lemos e seu esposo Ney Moura Lemos pela orientação, confiança e amor pela ciência. Obrigado por confiarem; obrigado por tudo.

As professoras Eleni Souto, Valéria Soraia e Maria das Graças de Almeida pelo irrestrito apoio e estímulo.

Ao professor Flávio Henrique Miranda pelas valorosas lições de bioestatística.

Um grande e sincero obrigado a Dayanne Cristina Dantas e Fabiano Barros de Medeiros, voluntários de iniciação científica, pela dedicação, bom humor e por aquilo que se ensinou e se aprendeu.

Aos colegas de pós graduação e iniciação científica pelo senso de coletividade e dedicação a pesquisa.

A Ana e Washigton Rocha pelo zelo e competência a frente do biotério.

A Tereza Cristina, meu amor, pela paciência e carinho. E aos meus pais e irmãos pelo que somos...

... Dedico este trabalho.

LISTA DE TABELAS

- TABELA 01** – Classificação dos Inibidores da aromatase. pág. 05
- TABELA 02** – Descrição dos grupos experimentais avaliados em momentos distintos (intervalo de 2 meses) em relação a peso e idade, duração do ciclo estral e quantidade de ciclos avaliadas. Natal, RN. pág. 22
- TABELA 03** – Síntese dos achados citológicos característicos a cada fase do ciclo em relação ao tipo celular predominante e quantidade de material (celularidade) quando usada a técnica policromática de coloração. Natal, RN. pág. 33
- TABELA 04** – Frequência relativa das fases do ciclo em horas segundo a classificação de ASTWOOD apud MANDL (1951) nos grupos experimentais e em alguns trabalhos da literatura. pág. 34
- TABELA 05** – Índice maturativo obtido em cada fase do ciclo apresentando a proporção relativa percentual das células profundas, intermediárias e superficiais. Natal, RN. pág. 35
- TABELA 06** – Índice maturativo de Meisler nos grupos I e II. Natal, RN. pág. 37
- TABELA 07** – Descrição do grupo experimental avaliado em relação a peso e idade, duração do ciclo estral e quantidade de ciclos e sua comparação com os dados obtidos na etapa anterior do estudo. Natal, RN. pág. 39
- TABELA 08** – Síntese dos achados citológicos característicos a cada fase do ciclo em relação ao tipo celular predominante e quantidade de material (celularidade) quando usada a técnica monocromática de coloração. Natal, RN. pág. 46
- TABELA 09** – Frequência relativa das fases do ciclo em horas segundo a classificação de Astwood apud Mandl (1951) com a técnica policromática de Papanicolaou (grupo I & II) e a monocromática com azul de Evans (AE) (grupo III). Natal, RN. pág. 46
- TABELA 10** – Índice maturativo obtido em cada fase do ciclo apresentando a proporção relativa percentual das células profundas, intermediárias e superficiais quando utilizada a técnica monocromática. pág. 48
- TABELA 11** – Índice maturativo de Meisler com a técnica policromática de Papanicolaou (grupo I & II) e a monocromática com AE (grupo III). Natal, RN. pág. 48
- TABELA 12** – Descrição dos grupos experimentais antes da administração dos fármacos hormonioterápicos. Natal, RN. pág. 50

TABELA 13 – Concentrações séricas de glicose, uréia , creatinina, colesterol, triglicérides, TGO e TGP nos grupos avaliados. pág. 52
Natal, RN.

TABELA 14 – Cálculo da área sob a curva das funções descritas na figura 24. Natal, RN. pág. 61

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 01** – Distribuição do material celular por citocentrifugação apresentando células superficiais queratinizadas com baixa sobreposição e aglomeração reduzida (100 x, coloração adaptada de Papanicolaou). FONTE: dados de pesquisa. pág. 26
- FIGURA 02** – Célula profunda de epitélio vaginal murino mostrando formato arredondado, núcleo volumoso e forte cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 27
- FIGURA 03** – Célula intermediária de epitélio vaginal murino mostrando formato poligonal, núcleo condensado e cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 28
- FIGURA 04** – Célula superficial de epitélio vaginal murino mostrando formato poligonal, núcleo condensado e cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 28
- FIGURA 05** – Estro (400 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 29
- FIGURA 06** – Estro tardio (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou). FONTE: dados de pesquisa. pág. 30
- FIGURA 07** – Diestro precoce (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou). FONTE: dados de pesquisa. pág. 30
- FIGURA 08** – Diestro (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 31
- FIGURA 09** – Estro precoce (400 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 32
- FIGURA 10** – Duração relativa das fases do ciclo estral. E.D. = diestro precoce; D. = diestro; L.D. = diestro tardio; E.O. = estro precoce; P.P.O. = pré -estro; P.O. = pró-estro; O. = estro; L.O. = estro tardio; M. = metaestro. FONTE: MANDL, 1951. pág. 34
- FIGURA 11** – Média e desvio padrão dos valores de Meisler para os grupos I e II. FONTE: dados de pesquisa. pág. 37
- FIGURA 12** – 6,6'- [3,3'- dimetil (1,1'- bifenil) – 4,4'- deil] bis (azo) - bis - (4 - amino - 5 - hidróxi) - 1,3 – naftalenodisulfônico ácido; sal tetrasódico (C₃₄H₂₄N₆O₁₄Na₄, PM = 960,842). Index color 2005: 23860, direct blue 53. FONTE: MERCK..., 1989. pág. 40
- FIGURA 13** – Células profundas de formato esférico e núcleo volumoso intensamente cianófilo; intermediárias de maior extensão e menor cromoafinidade nuclear e citoplasmática; e células pág. 41

- superficiais anucleadas e transparentes. FONTE: dados de .
- FIGURA 14** – Estro (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 42
- FIGURA 15** – Estro tardio (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 43
- FIGURA 16** – Diestro precoce (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 43
- FIGURA 17** – Diestro (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados. pág. 44
- FIGURA 18** – Estro precoce (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa. pág. 45
- FIGURA 19** – Média e desvio padrão dos valores de Meisler para os grupos III e I & II. FONTE: dados de pesquisa. pág. 49
- FIGURA 20** – Duração em dias dos ciclos nos grupos tratados (valores em média e desvio padrão). TAM: $p < 0,05$ a partir do 1º ciclo em relação ao controle, ANA: $p < 0,05$ a partir do 3º ciclo em relação ao controle e EXE: $p < 0,05$ a partir do 2º ciclo em relação ao controle. FONTE: dados de pesquisa. pág. 53
- FIGURA 21** – Duração das fases em dias nos grupos experimentais. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ANOVA, $p < 0,05$). FONTE: dados de pesquisa. pág. 54
- FIGURA 22** – Valores de Meisler para os grupos experimentais em cada fase do ciclo. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). FONTE: dados de pesquisa. pág. 55
- FIGURA 23** – Correlação por cálculo de área entre os valores de Meisler (%) e a duração das fases do ciclo (dias) para os grupos experimentais. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, ° estatisticamente significativo em relação ao grupo ANA ($p < 0,05$). FONTE: dados de pesquisa. pág. 57
- FIGURA 24** – Regressão não-linear por *spline* cúbica da correlação por cálculo de área entre os valores de Meisler (%) e a duração das fases do ciclo (dias) para os grupos experimentais. FONTE: dados de pesquisa. pág. 61

RESUMO

A hormonioterapia é um importante recurso no tratamento do câncer de mama e o tamoxifeno representa o fármaco mais empregado neste tipo de tratamento. Recentemente foram desenvolvidos outros fármacos baseados na inibição da aromatase, enzima responsável pela síntese de esteróides estrogênicos a partir de androgênios. O objetivo deste estudo seria o desenvolvimento de um modelo citológico quantitativo de análise estral murina que permitisse a caracterização dos efeitos farmacológicos de diferentes hormonioterápicos sob epitélio vaginal. A técnica de coloração monocromática com Azul de Evans (C.I. 23860) mostrou-se eficaz na classificação qualitativa e quantitativa do ciclo. Observou-se diferenças no padrão citológico de animais submetidos aos fármacos em estudo; onde o tamoxifeno apresentou alargamento das fases de menor maturação (diestrais), enquanto que o anastrozol e o exemestano incrementaram a duração das fases de maior maturação (estrais). O tratamento dos dados através de uma regressão não linear por *spline* cúbica permitiu melhor caracterização dos fármacos, sugerindo um perfil citológico próprio ao antagonismo do receptor de estrógeno (tamoxifeno), competição da aromatase (anastrozol) e inibição da enzima (exemestano).

DECRIÇÕES: Inibidores da aromatase, Citologia em base líquida, Modelo animal

ABSTRACT

Hormone therapy is an important tool in the treatment of breast cancer and tamoxifen represents one of the most important drugs used in this type of treatment. Recently other drugs based on the inhibition of aromatase had been developed, this enzyme is responsible for the synthesis of estrogenic esters from the androgenic ones. The objective of this study would be the development of a quantitative cytological model of murine estral analysis that allowed the characterization of different hormone drugs effect over vaginal epithelium. The technique of monochromatic staining with Evans blue (C.I. 23860) showed to be efficient in the qualitative and quantitative classification of the cycle. It had been observed differences in the cytological standard of animals submitted to the studied drugs; tamoxifen presented a widening of phases of lesser maturation (diestrais), while anastrozole and exemestane increased the duration of the phases of larger maturation (estrais). The data were analysed through a cubical non linear regression (spline) which allowed a better characterization of the drugs, suggesting a proper cytological profile to the antagonism of the estrogen receptor (tamoxifen), aromatase competition (anastrozole) and inhibition of the enzyme (exemestane).

Key words: aromatase inhibitors, liquid based cytology, animal model

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 O câncer de mama no Brasil e no mundo.....	01
1.2 A hormonioterapia no tratamento do câncer de mama....	02
1.3 Modelos experimentais na pesquisa farmacológica.....	06
1.4 O ciclo estral murino.....	08
1.5 Avaliação citológica e citologia em base líquida.....	10
2. JUSTIFICATIVA.....	14
3. OBJETIVOS.....	15
4. METODOLOGIA.....	16
4.1 Estudo citológico primário.....	16
4.2 Estudo citológico secundário.....	18
4.3 Administração dos fármacos hormonioterápicos.....	19
4.4 Tratamento estatístico.....	20
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 Estudo citológico primário.....	22
5.2 Estudo citológico secundário.....	38
5.3 Administração dos fármacos hormonioterápicos.....	49
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS.....	64
8. ANEXOS.....	75

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer de mama no Brasil e no mundo

Apesar do expressivo avanço no diagnóstico e tratamento, o câncer de mama representa ainda importante e permanente desafio para os responsáveis em saúde pública. Apresenta-se como a principal causa de óbito feminino por câncer, em países desenvolvidos e a segunda em países em desenvolvimento (AMERICAN..., 2005; ARAUJO, 2000; SMITH et al, 2003).

É considerada doença complexa e multifatorial que sofre fortes influências de fatores genéticos e ambientais. Sua incidência cresce progressivamente e atinge mulheres cada vez mais jovens como evidenciado pelo *Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group* (1992). É o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e, de longe, o mais freqüente entre as mulheres, sendo que possivelmente houve um milhão de novos casos para o ano de 2004, significando 22% de todos os casos de câncer (JEMAL et al, 2004).

No Brasil, conforme o Instituto Nacional do Câncer (BRASIL..., 2005), a estimativa de novos casos de neoplasias mamárias em mulheres para o ano de 2005 seria de 49.470, com uma taxa bruta de 52,93 por 100.000 habitantes. Dados similares àqueles projetados para o continente sul-americano por outros estudos multicêntricos (EARLY BREAST..., 1992; O'BRIEN, 2003). Para a região nordeste estima-se em torno de 7.090 casos (27,23/100.000 habitantes), 490 destes no estado do Rio Grande do Norte. A estimativa de óbitos também é

elevada (BRASIL..., 2005) e deverá atingir 1280 mulheres na referida região e 100 em nosso estado.

As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente são a cirúrgica e a radioterápica para o tratamento loco-regional, e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico (KRISHNAN et al, 2002; MS/INCA, 2004).

1.2 A hormonioterapia no tratamento do câncer de mama

À cerca de um século, Beatson segundo Kudchadkar e O'rgan (2005), observou que a ooforectomia causava regressão no tamanho de tumores de mama em pacientes pré-menopausadas; posteriormente, no início da década de 70, os receptores de estrogênios foram identificados no lóbulo mamário humano e este fato impulsionou a pesquisa de medicamentos que pudessem proporcionar efeito antiproliferativo baseado em mecanismos hormonais (FACINA et al, 2003). A hormonioterapia se estabeleceu rapidamente como um tratamento eficaz, seguro e barato para a neoplasia de mama em vários dos seus estágios; sua aplicabilidade inicialmente se restringia ao manuseio da doença metastática, mas posteriormente assumiu um importante papel no tratamento adjuvante e neoadjuvante (AZRIA et al, 2004; DOMONT et al, 2004; LAKE, HUDIS, 2002).

A grande maioria das pacientes se apresenta com doença localizada, mas, em até metade dos casos, a doença evolui com metástase. Para estes pacientes, o tratamento é paliativo, no entanto, visa também um aumento na sobrevida, de acordo com a instrutiva revisão de Saad e colaboradores (2002).

Entre as diversas formas de tratamento hormonal, destacam-se os antiestrógenos (p.ex. o tamoxifeno), que podem ser usados antes ou após a menopausa. Estes fármacos atuam como antagonistas do estrógeno; i.e., eles

competem pelo receptor estrogênico presente no núcleo celular de tecidos responsivos (BARRON-GONZALES, ARIAS-MARTINES, CASTRO-ROMERO, 2001; HIRSIMAKI, AALTONEN, MANTYLA, 2002). Para mulheres pré-menopausadas, existe ainda a opção da castração, seja ela farmacológica (através de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas, como a goserolina), cirúrgica ou radioterápica (INCA/MS, 2001).

Cuzick e Baum (1985) foram os primeiros autores a referir menor incidência do carcinoma contralateral em usuárias de tamoxifeno. Em estudo metanalítico, o *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* (1992) observou diminuição na incidência de recidiva local e de morte nas pacientes que tomaram tamoxifeno. A redução de carcinoma contralateral foi de 13, 26 e 47%; respectivamente, entre as que receberam a droga durante um, dois e cinco anos.

O tamoxifeno é o fármaco mais comumente prescrito para o tratamento hormonal do câncer de mama e possui um grande universo de estudos prospectivos sobre seu uso e eficácia (WICKERHAM, 2002). Apresenta-se como um composto não esteróide que se liga ao receptor estrogênico e atua tanto como agonista quanto como antagonista do estrógeno. Em virtude desta dualidade de ação, agora é referido como modulador seletivo do receptor estrogênico ou, utilizando-se a sigla em língua inglesa, SERM (ALBERTAZZI, PURDIE, 2000).

A literatura descreve a relevância de alterações endometriais em pacientes com câncer de mama tratadas com tamoxifeno (BIGLER et al, 2004; FEITOSA, JUACABA, MEDEIROS, 2002; HIRSIMAKI, AALTONEN, MANTYLA, 2002; PETERS-ENGL et al, 2000). A análise retrospectiva de uma coletânea de 55 ensaios clínicos *randomizados* mostraram que a incidência de câncer de endométrio teve incremento de duas vezes com 1 a 2 anos de uso do tamoxifeno

e de 4 vezes com 5 anos de uso (EARLY BREAST..., 1992). Este perfil adverso do tamoxifeno decorre de sua ação parcialmente estrogênica. Enfatizando-se a proliferação endometrial, com risco aumentado de adenocarcinoma, e os fenômenos tromboembólicos associados a este fármaco (LEVINE et al, 2005; NAYFIELD, GORIN, 1996; SAAD et al, 2002; STEWARTH et al, 1996). Assim, tratamentos hormonais menos tóxicos e com eficácia igual ou superior vêm sendo buscados. À cerca de vinte anos, estes esforços culminaram em uma nova classe de agentes hormonais utilizados no tratamento adjuvante do câncer de mama, denominados inibidores da aromatase (RAVDIN, 2004).

Os inibidores de aromatase (IA) suprimem os níveis estrogênicos em mulheres pré-menopausadas por inibirem ou inativarem a aromatase, enzima responsável pela síntese de estrógeno a partir de substratos androgênicos (KUDCHADKAR, O'REGAN, 2005; LAKE, HUDIS, 2002; SMITH et al, 2003).

Os inibidores da aromatase podem ser classificados de várias formas (Tabela 1). Quanto à sua estrutura química e tipo de inibição enzimática, as drogas são classificadas em inibidores propriamente ditos, com estrutura não-esteróide, e inativadores, com estrutura esteróide. Outra classificação possível é quanto à geração. Assim, a aminoglutetimida é considerada o inibidor da aromatase de primeira geração, e o fadrozol e o formestano, os inibidores de segunda geração. Os outros fármacos, objetos principais desta revisão, são de terceira geração, e incluem o anastrozol, o letrozol e o vorozol, entre os inibidores, e o exemestano, entre os inativadores. A diferença principal, do ponto de vista químico e farmacológico entre os inibidores e os inativadores é que estes últimos se ligam de forma definitiva à enzima, enquanto que aqueles funcionam, principalmente, como antagonistas competitivos, ligando-se à enzima apenas

temporariamente (DOWSSET, JOHNSTON, JACOBS, 1995; FOYE, LENKE, WILLIANS, 1995).

TABELA 1 - Classificação dos Inibidores da aromatase.

Inibidores da Aromatase (IA)		
	Inibidores (não esteróides)	Inativadores (esteróides)
Primeira geração	Aminoglutetimida	-
Segunda geração	Fadrozol	Formestano
Terceira geração	Anastrozol, Letrozol, Vorozol	Exemestano

Fonte: DOWSSET, JOHNSTON, JACOBS, 1995.

O primeiro dos fármacos de terceira geração avaliados para uso clínico foi o anastrozol, um potente e seletivo IA não esteroidal. Mais de 680.000 pacientes foram submetidas ao tratamento o que reforça seu papel, assim como o de outros IA's (letrozol e examestano), como novas armas no arsenal da hormonioterapia contra o câncer de mama (BUZDAR, 2004)

No entanto, este novo grupo farmacológico levantou algumas questões cruciais; Ravdin, em seu artigo de revisão publicado na Community Oncology (2004), expôs alguns pontos pertinentes:

[...] Qual a melhor estratégia em termos de eficácia para o uso destes agentes: associados, antes ou após o tamoxifeno? Qual o grau de segurança após um tratamento de 5 anos? Que outros esquemas terapêuticos poderiam ser eficazes? Quais biomarcadores poderiam ser utilizados para selecionar pacientes adequados a terapia com inibidores da aromatase (IA) ou a com tamoxifeno? Qual a eficácia comparada entre os IA frente ao tamoxifeno e sua relação custo/benefício? (RAVDIN, 2004, p. 219).

Logo, muitos aspectos sobre estes novos fármacos ainda devem ser elucidados e compreendidos por meio de metodologias diversas; sendo o estabelecimento de modelos animais uma importante ferramenta no campo da investigação científica (ZUBER, ANZENBACHEROVÁ, ANZEBACHER, 2002).

1.3 Modelos experimentais na pesquisa farmacológica

Entende-se por experimentação um procedimento levado a efeito, visando descobrir princípio ou efeito desconhecido, pesquisar uma hipótese ou ilustrar um princípio ou fato conhecido. No caso da “experimentação animal”, refere-se a procedimentos realizados em animais; que definidos em uma abordagem ampla, referem-se aos seres pertencentes ao Reino *Animalia*, excluindo-se os animais humanos (PAIXÃO, 2001). Em 1620, Francis Bacon estabeleceu as bases da ciência experimental e enfatizou o uso de animais para o desenvolvimento de novos tratamentos para o homem (MATFIELD, 1996).

Praticamente toda espécie animal pode ser tomada como modelo, dependendo do objetivo da investigação, logo, para cada um, se necessita de parâmetros distintos para sua manutenção. No estabelecimento destes critérios, deve-se conhecer profundamente o objeto animal e sua fisiologia (FERNANDEZ, 2001).

Dentro da farmacologia experimental é essencial o conhecimento dos mecanismos moleculares e metabólicos inerentes ao fármaco em estudo. Não só para princípios ativos amplamente testados, como também para fármacos novos submetidos às agências reguladoras. Neste processo, a experimentação animal é amplamente utilizada. Vários são os fatores que governam os dados obtidos para fins científicos, sobretudo, a seleção de compostos com potencial de uso humano. Dentre estes fatores, pode-se destacar a relevância do modelo animal para a patologia em estudo e a farmacocinética comparativa entre homem e animal (ZUBER, ANZENBACHEROVÁ, ANZEBACHER, 2002).

Para muitos fármacos, a eficácia *in vivo* depende de três características: (1) a potência intrínseca do composto a qual é normalmente determinada *in vitro*

usando sistemas receptores ou enzimáticos isolados; (2) a dinâmica patológica ou fisiológica do alvo, por exemplo, *turnover* de enzimas/receptores ou concentração de ligantes/substratos, (3) a farmacocinética do composto em si (DUKES, 1997). A avaliação destas três características nem sempre constitui um procedimento acessível do ponto de vista técnico e financeiro, sobretudo para instituições de menor projeção e fora da realidade dos grandes centros de pesquisa nacionais. Neste quadro a busca de alternativas é válida e necessária onde se deve aliar a simplicidade com o rigor científico.

O escopo deste trabalho seria um método de experimentação específico para fármacos atuantes na cascata de ação e metabolização estrogênica, SERM's (selective estrogen receptor modulators) e AI (aromatase inhibition). Devido às dificuldades de se estudar a fisiologia reprodutiva feminina pelas restrições éticas, o modelo experimental surge como uma boa opção para pesquisa. Dentre os modelos, o animal que se assemelha à mulher em relação ao estudo endócrino reprodutivo é a rata. Seu ciclo endócrino (estral) foi importante para a compreensão do ciclo menstrual e a morfologia cervicovaginal apresenta comportamento citogenético similar (SHIDA et al, 2001).

Vários autores desenvolveram técnicas calcadas na análise histológica apresentando um ótimo valor preditivo dos efeitos destes fármacos nos tecidos mamários e endometriais. Dentre estas técnicas, destaca-se o trabalho pioneiro de Barraclough (1961), o qual, por meio da análise histológica de tecido mamário murino sob estímulo estral contínuo, possibilitou diversos avanços; sendo ainda hoje uma metodologia muito empregada (SILVA et al, 2000). No entanto, estes trabalhos apresentam o inconveniente próprio da análise histológica, a avaliação do espécime em um período estático de tempo o que poderia ser sanado por

meio de uma metodologia citológica não invasiva. Ou seja, o uso de um modelo experimental calcado na observação citológica do ciclo estral apresentaria a chance de delinear a dinâmica do processo.

1.4 O ciclo estral murino

Em 1917, Stockard e Papanicolaou desenvolveram um método que consistia na examinação microscópica de fluidos vaginais em pequenos mamíferos (guinea pig, *Cavia porcelus*). Eles observaram que o muco vaginal contém uma variedade de células descamadas, leucócitos degenerados, alguns eritrócitos e largo número de bactérias. O número relativo e a distribuição destes elementos mudavam periodicamente, esfregaços preparados destes fluidos demonstravam esta periodicidade em sua composição e estrutura.

Muitos trabalhos que exploraram a citologia murina foram publicados a seguir, destacando-se alguns considerados clássicos pela relevância e pioneiros em experimentação animal, como os estudos de Long & Evans (1922), Papanicolaou (1933), Mandl (1951), Whitten (1958) e Davdson (1962).

Papanicolaou, em seu célebre trabalho *The Sexual Cycle the Human Female as Revealed by Vaginal Smears* de 1933, afirma:

[...]Uma revisão comparativa de todas as investigações conduzidas em várias classes de mamíferos mostra que os resultados obtidos em roedores são satisfatórios no entendimento inicial da fisiologia reprodutiva. As mudanças observadas no esfregaço vaginal é um reflexo característico das mudanças sofridas nos ovários e útero. O tempo de ovulação pode ser diagnosticado nos roedores através de sinais característicos no esfregaço. A rítmica sexual pode ser facilmente estabelecida na observação microscópica de coletados vaginais” (PAPANICOLAOU, 1933, p. 523).

Com este artigo, o autor fundou a citologia cérvico-vaginal moderna e sedimentou o conhecimento da relação entre a citologia vaginal e a função

ovariana, representando para fisiologistas e bioquímicos um poderoso instrumento experimental. (SANTOS, FERRAZZOLI, 2005).

O termo estro refere-se estritamente ao período durante o qual a fêmea permite a copulação; este usualmente coincide com o máximo desenvolvimento dos órgãos associados com a ovulação (DAVSON, EGGLETON, 1962). A denominação ciclo estral refere-se ao fenômeno rítmico observado em todos os mamíferos envolvendo um regular, mas limitado período de receptividade sexual que ocorre a intervalos característicos de cada espécie sendo este tempo conhecido como período do ciclo. (DAVSON, EGGLETON, 1962; SANTOS, FERRAZZOLI, 2004; WHITTEN, 1958).

Long e Evans (1922), em seu trabalho sobre ciclo estral de ratas (*Rattus norvegicus albinus*, Rodentia mammalia), descreveram de forma conclusiva correlações entre o ciclo vaginal, revelado através de esfregaço vaginal, e os ciclos uterinos e ovarianos. O rato normalmente apresenta uma periodicidade sexual extremamente curta, em torno de 5 dias. Long e Evans estabeleceram cinco estágios para este ciclo: Estágio 1: leucócitos desaparecem; grande números de células epiteliais pequenas e nucleadas de tamanho e forma homogêneas, duração de 12 horas. Estágio 2: leucócitos ausentes, presença de células queratinizadas. Estágio 3: abundância de células queratinizadas formando grandes massas com grande justaposição e morfologia peculiar (“*cheese cake*”, SIC) ; sendo a duração do estágio 2 e 3 em torno de 30 horas. Estágio 4: reaparecimento dos leucócitos, gradual diminuição das células queratinizadas e aumento das epiteliais; 6 horas de duração. Estágio 5 corresponde ao diestro com duração aproximada de 3 dias e caracterizado pela presença de leucócitos e células epiteliais atípicas no esfregaço vaginal.

Em 1939, Astwood (apud MANDL, 1951) estabeleceu critérios mais precisos na divisão das fases do ciclo, permitindo uma análise mais apurada e um uso mais abrangente no campo da farmacologia dos esteróides sexuais (MANDL, 1951). Sendo as mucosas vaginal e uretral sensíveis aos esteróides ovarianos, as células delas esfoliadas traduzem a ação desses hormônios, permitindo, por meio de sua análise, saber o estado funcional do ovário (LENCIONI, 1987; SARTORI et al, 1995).

Uma revisão comparativa de todas as investigações conduzidas em várias classes de mamíferos mostra que os resultados obtidos em roedores são satisfatórios no entendimento inicial da fisiologia reprodutiva. As mudanças observadas no esfregaço vaginal são um reflexo característico das mudanças sofridas nos ovários e útero. O tempo de ovulação pode ser diagnosticado nos roedores através de sinais característicos no esfregaço. A rítmica sexual pode ser facilmente estabelecida na observação microscópica de coletados vaginais (PAPANICOLAOU, 1933).

1.5 Avaliação citológica quantitativa e citologia em base líquida

A avaliação hormonal de esfregaços cérvico-vaginais reflete a funcionalidade do epitélio frente à influências dos hormônios ovarianos; podendo esta avaliação assumir o caráter qualitativo quando se observa parâmetros como predominância celular, modo de descamação, flora bacteriana e muco. No entanto, um critério quantitativo pode ser estabelecido por meio de índices (GRIMALDO, 2002).

Dentre os vários índices que existem para classificar as influências hormonais no epitélio vaginal e urinário, os mais utilizados são o índice de maturação celular, o índice de cariopcnose e o de eosinofilia. Porém, dependem

da variação citológica individual do epitélio e da interpretação pessoal de diferentes observadores. O índice de maturação celular ou de Frost parece ser o mais informativo de todos e consiste na determinação de células profundas, intermediárias e superficiais (P/I/S), expressas em porcentagem (CARVALHO, 2002; LENCIONI, 1987; LUSTOSA et al, 2002).

O valor de maturação ou índice de Meisels é calculado a partir do índice de maturação celular, e corresponde ao somatório do número das células profundas multiplicadas por zero, do número de células intermediárias multiplicadas por meio e do número de células superficiais multiplicadas por um (profundas x 0 + intermediárias x 0,5 + superficiais x 1), sendo mais utilizado para a comunicação entre citologistas e em trabalhos científicos, porém, não indicado para dar laudos citológicos destinados ao clínico (LUSTOSA et al, 2002).

O epitélio vaginal da rata também sofre mudanças citológicas similares em relação ao grau de maturação, modo de descamação e presença de outros elementos no esfregaço; apesar destas alterações ocorrerem de forma mais dinâmica devido a menor duração do ciclo (ANDRADE, BARACAT, 1999). Logo, a metodologia utilizada na avaliação quantitativa hormonal da mulher, possivelmente poderia ser redirecionada para a fisiologia murina.

As técnicas de coleta, fixação e coloração de um preparado citológico representam uma etapa crítica no processo de análise, sobretudo quando direcionada experimentalmente para animais de pequeno porte como ratas da linhagem Wistar (MARCONDES, 2001; PAPANICOLAOU, 1933). Desta forma, a citologia esfoliativa pode representar um fator interferente importante devido à natureza do objeto experimental e a característica quantitativa da análise.

A citologia de base líquida surgiu para atender às demandas de escrutínio computadorizado. Para viabilizar a leitura das lâminas por computadores, era necessário um preparado que apresentasse o menor número possível de artefatos e sobreposições celulares; dessa forma, os preparados citológicos em base líquida foram chamados a princípio de citologia de monocamada ou camada fina (PEREIRA et al, 2003; TAKAHASHI, NAITO, 1997; VELASCO, 2001). O número de células em meio líquido é considerado ideal, uma vez que ao ser acomodado no recipiente, a quase totalidade das células coletadas são transferidas ao meio. Ao se preparar as amostras, essas células são *randomizadas* por agitação (independente dos métodos disponíveis no mercado) e oferecem, teoricamente, uma amostra mais representativa. Essa metodologia traz um grande avanço no preparo citológico, uma vez que há evidências de que apenas 20% do material colhido pelo método convencional esfoliativo é transferido para a lâmina; o restante, que está aderido à escova/espátula, é descartado (VELASCO, 2001). Além disso, tem sido advogado que a citologia de base líquida apresenta uma série de vantagens em relação a citologia cervical convencional; como características citomorfológicas nítidas e de fácil interpretação, melhor disposição celular (distribuição homogênea) e menor área de análise (BERNSTEIN, SANCHEZ-RAMOS, NDUBISI, 2001).

O epitélio vaginal da rata também sofre mudanças citológicas similares em relação ao grau de maturação, modo de descamação e presença de outros elementos no esfregaço; apesar destas alterações ocorrerem de forma mais dinâmica devido a menor duração do ciclo. Logo, a metodologia utilizada na avaliação quantitativa hormonal da mulher, possivelmente poderia ser redirecionada para a fisiologia murina.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama constitui um grave problema de saúde pública no Brasil e no mundo, justificando os grandes esforços empreendidos na pesquisa de novas armas terapêuticas.

Dentre estas, destaca-se a hormonioterapia de função adjuvante ou neoadjuvante ao uso de procedimentos cirúrgicos loco-regionais e quimioterápicos. Esta modalidade teve início com o advento dos moduladores de ação estrogênica, sendo o tamoxifeno o mais importante representante deste grupo. Apesar da eficácia desta classe, efeitos colaterais inerentes a seu mecanismo de ação parcial agonista – destacando-se o risco de proliferação endometrial e tromboembolismos – culminaram no desenvolvimento dos inibidores da aromatase (IA) como possível alternativa farmacológica.

O uso dos inibidores levantou vários questionamentos em relação à eficácia relativa frente ao tamoxifeno e frente aos próprios IA; como também o binômio custo/benefício e a relevância dentro dos protocolos terapêuticos atuais. Neste contexto, a validação de modelos experimentais *in vivo* que reflitam a dinâmica fisiológica destes princípios ativos podem ser úteis para elucidar e delimitar as características singulares a cada um deles.

Nossa proposta compreende o estabelecimento de um modelo citológico quantitativo de análise estral murina que aliasse praticidade ao baixo custo; adaptando metodologias clássicas a técnicas recentes como a citologia em base líquida. Este modelo permitiria a caracterização de um perfil inerente a cada fármaco possibilitando maiores subsídios para a triagem e classificação de novos representantes desta classe.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecimento de um modelo experimental que permita a avaliação citológica do epitélio vaginal murino sob ação de fármacos utilizados na hormonioterapia do câncer de mama.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolvimento de uma metodologia de coleta em base líquida e posterior coloração pela técnica clássica de Papanicolaou (1933) para avaliação citológica do ciclo estral de ratas wistar;
- Desenvolvimento de uma metodologia de coleta e coloração monocromática em base líquida para avaliação citológica do ciclo estral de ratas wistar;
- Caracterização do ciclo estral murino através de índices citológicos nas técnicas desenvolvidas;
- Caracterização do perfil citológico de animais sob ação de moduladores estrogênicos frente à inibidores da aromatase utilizando as técnicas propostas.

4. METODOLOGIA

4.1 Estudo citológico primário

4.1.1 Animais

Foram utilizadas 30 ratas (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*) com idade média de três meses e pesando entre 180 – 200g. Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, grupo I (20 espécimes) e grupo II (10), sendo a avaliação de cada grupo efetivada em momentos distintos (2 meses de diferença). Os animais foram submetidos à ração padrão (Labina-Purina, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* nas dependências do Biotério Central (CCS/UFRN). Sob temperatura em torno de 25°C e ciclos claro/escuro aproximados de 10 horas (8h – 18h) obtidos artificialmente por meio de lâmpadas fluorescentes de 40W. Os espécimes permaneciam confinados em gaiolas plásticas com suporte metálico de proteção, o número máximo de animais por grupo foi fixado em cinco e entre as gaiolas um macho jovem foi colocado como estímulo olfativo para regularização dos ciclos (WHITTEN, 1958). Antes do início da etapa experimental, procedeu-se a duas semanas de adaptação nas condições descritas.

4.1.2 Coleta e processamento das amostras citológicas

Os animais foram submetidos a coletas diárias matinais (8:00 h) por um período de 30 dias. No processo de coleta utilizou-se pipetas plásticas de Pasteur com 151 mm de comprimento e 1,5 mm de diâmetro na extremidade, sendo esta introduzida delicadamente na abertura vaginal veiculando cerca de 0,2 mL de solução salina 0,9% estéril. O lavado vaginal obtido foi homogeneizado com 1 mL de solução fixadora (álcool anidro 96° e éter 30%, 1:2), sendo o tempo mínimo de fixação de 30 minutos e o máximo de 4 horas.

Após a fixação, o material foi homogeneizado em *vortex*, em alta velocidade, por 5 segundos, e processado em citocentrífuga Fanem modelo 1001. Cada amostra foi realizada em duplicata onde 0,25 mL do fixado foi centrifugado a 1200 rpm por 2 minutos sob lâmina de microscopia de 26x76 mm, o material obtido foi imediatamente fixado em etanol 95° para posterior coloração sendo o tempo médio de fixação de 24 horas.

As lâminas processadas na etapa anterior foram coradas utilizando a técnica de Papanicolaou adaptada pela disciplina de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas desta instituição (Anexo 1); esta técnica possui um caráter policromático. Antes da avaliação citológica, as lâminas foram montadas com lamínula de vidro de 16x16mm em óleo mineral.

4.1.3 Avaliação Citológica

Os esfregaços foram avaliados por microscopia ótica sob objetivas de 10, 20 e 40 vezes. Características como tamanho celular, relação núcleo/citoplasma, cromoafinidade, modo de descamação e transparência citoplasmática foram utilizadas para classificar as células em profundas, intermediárias e superficiais segundo o descrito por Papanicolaou em 1933. A delimitação das fases do ciclo seguiu a classificação utilizada por Mandl em 1951 que compreende o estro precoce (EP), estro (E), estro tardio (ET), diestro precoce (DP), diestro (D) e diestro tardio (DT). Outros caracteres secundários como tipo de microbiota presente, infiltração leucocitária, muco e artefatos também foram observados e correlacionados às fases do ciclo.

Em cada fase delimitada procedeu-se a quantificação celular utilizando o índice maturativo de Meisler (IM) que foi calculado a partir do índice de maturação celular, correspondendo a soma dos percentuais de células profundas

multiplicadas por zero, intermediárias multiplicadas por meio e do número de células superficiais multiplicadas por um (%profundas x 0 + %intermediárias x 0,5 + %superficiais x 1). Um mínimo de 100 células foram observadas em cada esfregaço sendo este processo realizado em duplicata.

Nesta etapa experimental, 600 análises citológicas foram efetivadas em duplicata (1200 observações) no primeiro grupo e 300 duplicatas no segundo (600 observações).

4.2 Estudo citológico secundário

4.2.1 Animais

Foram utilizados 25 animais com as mesmas características e nas mesmas condições descritas no item 4.1.1. Este grupo foi denominado de III.

4.2.2 Coleta e processamento das amostras citológicas

Os animais foram submetidos a coletas diárias matinais (8:00 h) por um período de 30 dias. O mesmo procedimento de coleta também foi utilizado nesta etapa do estudo, no entanto o lavado vaginal foi fixado em 1 mL de etanol 50° por no mínimo 15 minutos e máximo de 1 hora. Após a fixação, o material foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos e desprezado o sobrenadante. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de solução Azul de Evans 0,5 % (index color: 23860) em solução aquosa de H₂SO₄ a 1%. Após 15 minutos, uma segunda centrifugação a 3500 rpm por 5 minutos foi executada e novamente desprezado o sobrenadante. Vinte microlitros do centrifugado foram colocados entre lâmina e lamínula para avaliação citológica (MARTINS, 2005; artigo em anexo).

4.2.3 Avaliação Citológica

Os esfregaços foram avaliados segundo os critérios expostos no item 4.1.3, mas não em duplicata. 720 análises citológicas foram efetivadas.

4.3 Administração dos fármacos hormonioterápicos

4.3.1 Animais

Foram utilizados 32 animais com as mesmas características e nas mesmas condições descritas no item 4.1.1. Os animais foram divididos em quatro grupos descritos a seguir os quais receberam doses diárias dos fármacos em estudo por 30 dias. A administração foi realizada por gavagem utilizando-se como veículo uma solução aquosa de sorbitol (Anexo 2).

- Grupo controle (CON) – 8 animais que receberam o veículo de sorbitol durante o período de estudo;
- Grupo tamoxifeno (TAM) – 8 animais, tamoxifeno (Nolvadex® AstraZeneca Pharmaceuticals, Maclesfield – UK) a 0,02 mg/Kg;
- Grupo exemestano (EXE) – 8 animais, exemestane (Aromasin® Pharmacia Italia, Ascoli Piceno – Itália) a 0,02 mg/Kg;
- Grupo anastrozol (ANA) – 8 animais, anastrozol (Arimidex® AstraZeneca Pharmaceuticals, Maclesfield – UK) a 0,001 mg/Kg.

Os fármacos foram obtidos a partir de comprimidos disponibilizados comercialmente, respectivamente nas apresentações de 20, 25 e 1 mg para tamoxifeno, exemestano e anastrozol. A forma farmacêutica foi pulverizada e posteriormente solubilizada no veículo de sorbitol.

A título de confirmação dos resultados, outro grupo experimental foi constituído em um segundo momento nas condições descritas acima, utilizando-se um grupo menor (20 animais divididos igualmente entre os quatro grupos).

4.3.2 Coleta e processamento das amostras citológicas

Antes do início da administração dos hormonioterápicos, procedeu-se a duas semanas de avaliação citológica com intuito de descartar os animais com ciclos estrais irregulares. O procedimento de coleta descrito no item 4.2.2 iniciou-se com administração dos fármacos em estudo por um período de 30 dias a contar do estro.

4.3.3 Avaliação Citológica

Os esfregaços foram avaliados segundo os critérios expostos no item 4.1.3, mas não em duplicata. Nesta etapa, executou-se cerca de 960 análises em um primeiro momento e cerca de 600, em um segundo.

4.3.4 Avaliação bioquímica

Após o fim do período experimental, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (thiopentax®, Cristália Ind. Farmacêutica) e o sangue coletado por punção cardíaca (cerca de 5 mL) e heparinizado de imediato. As quantificações bioquímicas foram realizadas em colorímetro semi-automatizado (RA-50, Bayer do Brasil S.A.) segundo recomendações do fabricante (LabTest @ LTDA). Os seguintes analitos séricos foram contemplados: glicose, uréia, creatinina, colesterol, triglicérides, aspartato amino transferase (AST) e alanino amino transferase (ALT).

4.4 Tratamento estatístico

Na avaliação estatística dos resultados foi empregada a Análise de Variância (ANOVA), de Kruskal-Wallis, para amostra não paramétrica e

independente, livre de distribuição (comparação entre os índices citológicos e duração das fases do ciclo); também empregou-se o Teste U de Mann & Whitney para comparação de grupos independentes (peso corporal, idade, perdas e duração total do ciclo). O grau de significância adotado foi de $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos e a geração dos gráficos mostrados foram executados através do programa Prism 4 for Windows (Graphpad Software Inc., 2004). A regressão não linear por *spline* cúbica foi executada por meio do *software* LabFit Mínimos Quadrados (UFMG, 2005) obtido via internet em modo *shareware*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo Citológico Primário

Desde a clássica descrição de Long & Evans (1922) das mudanças cíclicas observadas em esfregaços vaginais de ratos e sua possível aplicabilidade como modelo *in vivo* para caracterização de atividade ovariana; vários estudos foram desenvolvidos sobre o tema sugerindo modificações no processamento citológico (coleta, fixação, coloração e montagem) como também na caracterização celular e das fases do ciclo.

O intuito desta etapa do trabalho seria a adequabilidade das condições experimentais, familiarização com a dinâmica celular murina e a escolha de uma técnica de processamento que permitisse a quantificação por índices citológicos.

Uma preocupação inicial do estudo seria a verificação das condições do experimento, i.e., se a climatização, alimentação e linhagem dos animais seriam compatíveis com o descrito na literatura. A Tabela abaixo descreve dois grupos utilizados em momentos diferentes, com um intervalo de dois meses nas mesmas condições.

TABELA 2 – Descrição dos grupos experimentais avaliados em momentos distintos (intervalo de 2 meses) em relação a peso e idade, duração do ciclo estral e quantidade de ciclos avaliados. Natal, RN.

	Grupo I	Grupo II	Grupo I & II
Número	20	10	30**
Peso (g)*	185,3 ± 25,2	192,1 ± 33,4	188,7 ± 29,4
Idade (dias)*	98,4 ± 31,7	101,9 ± 12,0	100,15 ± 23,6
Perdas	2	0	2**
Ciclo (dias)*	4,8 ± 0,3	4,6 ± 0,9	4,7 ± 0,9
Ciclos avaliados	96 (18 animais)	37 (10 animais)	133**

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão, ** Somatória dos valores dos grupos I e II.

Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis peso, idade, perdas e duração do ciclo entre os dois grupos ($p < 0,05$).

O primeiro ciclo estral completo ocorre em torno da 5ª semana de vida juntamente com o alargamento da abertura vaginal, marcando o início da idade fértil; no entanto, ciclos regulares começam a se manifestar somente a partir da 7ª semana (KIM et al, 2002). Os animais utilizados neste estudo foram selecionados de acordo com a idade média de três meses a fim de evitar imaturidade sexual e ciclos instáveis; apesar dos cuidados dois espécimes apresentaram citologia não cíclica no grupo I e foram considerados como perdas. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de duração do ciclo estral nos dois grupos, apesar de sua análise ter sido feita em momentos distintos.

Em uma revisão sobre as fases do ciclo estral murino, Mandl (1951) descreveu os resultados encontrados por alguns autores sobre a duração do ciclo e o manejo experimental. Neste trabalho, o valor médio da duração dos ciclos e a idade de início das coletas (em torno de 3 meses de idade) são similares em todos os autores citados; abordam-se os trabalhos de Long & Evans ($4,3 \pm 0,07$ dias, 635 ciclos avaliados), Astwood ($4,5 \pm 0,11$ dias, 437 ciclos avaliados), Jaworski ($4,25 \pm 0,05$ dias) e da própria autora ($4,4 \pm 0,01$ dias, 659 ciclos). Em relação ao presente estudo observou-se concordância com o descrito na referida revisão, apesar da quantidade menor de ciclos estudados (Tabela 2). Isto apontaria para condições experimentais de temperatura, iluminação e alimentação adequadas ao objetivo do estudo, já que houve reprodutibilidade dos dados quando comparados ao exposto na literatura.

Stockard e Papanicolaou demonstraram em seu clássico estudo de 1917 que os esfregaços obtidos da mucosa vaginal murina poderiam facilmente ser classificados em fases distintas; no entanto uma boa coloração deveria ser usada para uma descrição mais detalhada. Posteriormente os autores desenvolveram

uma técnica com este intuito onde o material seria corado primeiramente com hematoxilina de Ehrlich, em seguida com eosina 3% e orange G 0,5%, finalizando com uma etapa de desidratação e de montagem com bálsamo do Canadá (PAPANICOLAOU, 1933). Este procedimento de coloração policromática sofreu várias modificações e hoje é largamente utilizado na coloração de raspados cervicovaginais em experimentação animal e na saúde humana.

A técnica de coloração adaptada utilizada neste estudo (Anexo 1) não difere significativamente da original apresentando bons resultados como será descrito a seguir; no entanto, a coleta por raspagem da mucosa vaginal murina compreende um procedimento delicado e passível de traumas ao tecido. Além disso, a coleta por raspagem acarreta fixação deficiente, material celular escasso, sobreposição de material, distribuição não aleatorizada e aumento de artefatos (RICCI et al, 2004).

Dentre as dificuldades apontadas; em pesquisa experimental com animais de pequeno porte, destaca-se justamente o ato da raspagem da mucosa vaginal. Caso se estabelecesse um processo inflamatório devido a este procedimento, haveria alterações nos caracteres do esfregaço e comprometimento de sua avaliação hormonal levando ao aumento das perdas durante o experimento (DAVSON, EGGLETON, 1962). Outro problema seria a indução de pseudogravidez (*pseudopregnance*) pela estimulação mecânica ocasionada pela coleta acarretando parada do ciclo (SINHA et al, 1979).

Outros autores optaram pela lavagem da cavidade vaginal com soluções estéreis e isotônicas como forma de contornar esta dificuldade (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002). O lavado obtido não poderia ser corado pela técnica proposta devido à ausência de fixação, ocasionando a sua avaliação imediata a

fresco. Este procedimento permitiria a diferenciação das fases do ciclo, porém inviabilizaria qualquer estudo mais acurado de caráter quantitativo.

Em nosso estudo, o material celular obtido por veiculação de solução salina estéril 0,9% na cavidade vaginal e imediata fixação do lavado em EtOH 95° / éter na proporção de 1:1 (metodologia descrita no item 4.1.2) contornou ambas as dificuldades, ou seja, tanto o trauma da coleta por raspagem quanto a dificuldade de fixação.

O estabelecimento das condições de citocentrifugação do lavado obtido (1200 rpm por 2 minutos) foi calculado no tamanho da área circular apresentada sobre a lâmina (5 mm de diâmetro) e a homogeneidade do material celular depositado, considerados ideais para uma boa avaliação. A disposição celular em suspensão no líquido fixador e a concentração deste diretamente sobre a superfície de leitura de forma homogênea e com baixa sobreposição, caracterizaria esta técnica como de base líquida em monocamada (BISHOP, 1998; BOLICK, 1998).

As amostras obtidas pela técnica apresentaram celularidade adequada ao estudo (Figura 1); uma vez que ao terem sido acomodadas em suspensão e posteriormente concentradas sobre a lâmina, a quase totalidade das células provavelmente foram transferidas. Observou-se a baixa presença de aglomerados celulares o que facilitaria a delimitação do ciclo e a avaliação de caracteres maturativos; indicando uma boa *randomização* do material por agitação.

As características citomorfológicas como formato nuclear e celular, bordas citoplasmáticas, transparência celular e elementos figurados (flora bacteriana, muco e leucócitos) foram bem evidenciadas pela coloração.

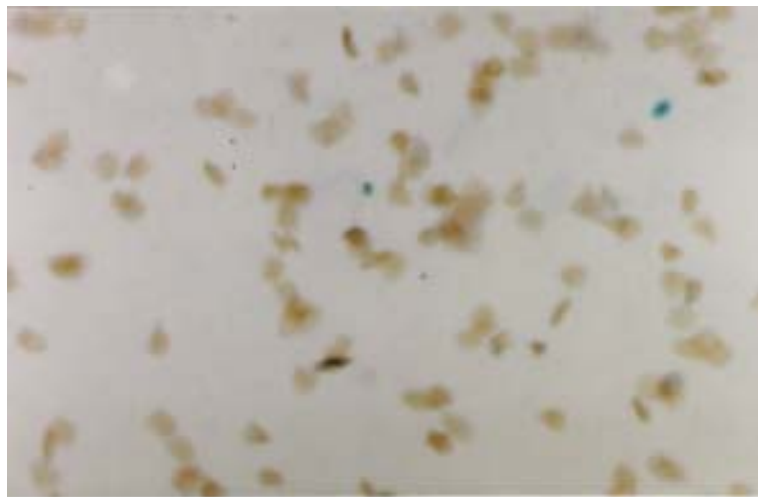


FIGURA 1 – Distribuição do material celular por citocentrifugação apresentando células superficiais queratinizadas com baixa sobreposição e aglomeração reduzida (100 x, coloração adaptada de Papanicolaou). FONTE: dados de pesquisa.

A análise de um esfregaço vaginal é, em grande parte, um exercício de classificação perante três tipos básicos celulares: células superficiais, intermediárias e profundas. Entretanto, é preciso ter em mente que as células refletem um *continuum*, onde algumas delas não se encaixarão perfeitamente dentro destas categorias rigidamente definidas (COLORADO..., 2005 ; ZOGMO, 2002).

Neste experimento, o estudo do ciclo estral foi baseado na dinâmica percentual destes tipos celulares provenientes da descamação do epitélio vaginal associado a outros caracteres como leucócitos, muco e restos celulares. Todos os tipos celulares citados puderam ser observados através da avaliação citológica desenvolvida neste estudo.

Células profundas apresentaram forte cianofilia e forma arredondada (Figura 2), o diâmetro celular foi de cerca de 15 μm apresentando um núcleo volumoso (8 μm) em uma relação núcleo / citoplasma (RNC) de 0,5.

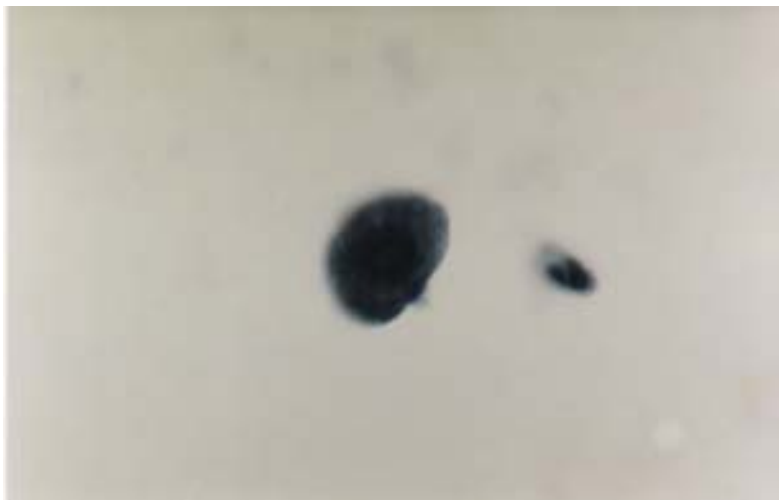


FIGURA 2 – Célula profunda de epitélio vaginal murino mostrando formato arredondado, núcleo volumoso e forte cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

As células intermediárias (Figura 3) mostraram-se com uma forma poligonal com um grau menor de cianofilia e uma variação maior de diâmetro celular e RNC (23 μm e 0,3). O núcleo das células intermediárias também se apresentou com volumes bastante heterogêneos, o que poderia acarretar a caracterização de subtipos celulares nesta classe; no entanto, optou-se pela manutenção da classificação proposta por Astwood (1939). As células superficiais (Figura 4) apresentaram volume maior (42 μm) e ausência de núcleo com marcante eosinofília; o formato poligonal se mostrou mais uniforme e a transparência celular se mostrou mais acentuada em relação aos demais tipos celulares.



FIGURA 3 – Célula intermediária de epitélio vaginal murino mostrando formato poligonal, núcleo condensado e cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.



FIGURA 4 – Célula superficial de epitélio vaginal murino mostrando formato poligonal, núcleo condensado e cianofilia (1000 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

Em nosso estudo, dentre as várias classificações citológicas consultadas (NELSON, 1982; ASTWOOD, 1939; PAPANICOLAOU, 1933; LONG & EVANS,

1922), preferiu-se a classificação proposta por Mandl (1951) descrita no item 4.1.3 pela adequação ao objetivo quantitativo deste estudo citológico.

O início do ciclo foi considerado na fase de estro (E), esta apresentou-se com intensa celularidade superficial e baixa sobreposição (Figura 5). No momento da coleta, observou-se a presença de muco vaginal abundante e ausência de leucócitos; a caracterização desta fase específica mostrou-se de fácil observação.

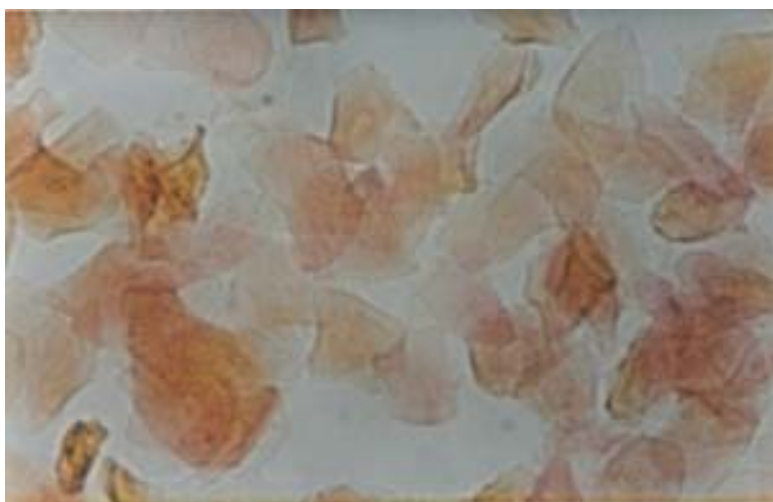


FIGURA 5 – Estro (400 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

A etapa seguinte do ciclo (Figura 6), o estro tardio (ET) denominada por autores recentes de metaestro (MARCONDES, BIANCHI, TANNO, 2002), apresentou características similares ao E, diferindo em uma menor celularidade e a presença de células nucleadas e poucos leucócitos.

No diestro precoce (DP), a presença de infiltração leucocitária aumenta significativamente em contraposição a diminuição das células do epitélio vaginal. Praticamente as superficiais desaparecem deixando células nucleadas com leve

predominância intermediária (Figura 7). Observa-se também um aspecto irregular citoplasmático e a presença de vacúolos.

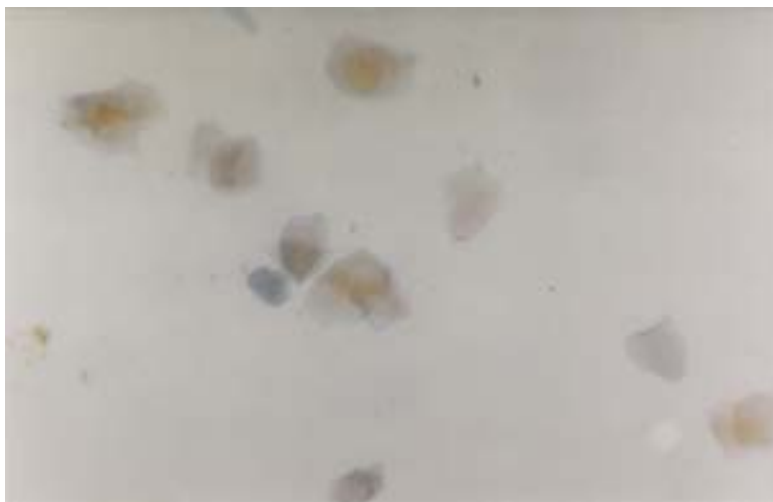


FIGURA 6 – Estro tardio (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou). FONTE: dados de pesquisa.

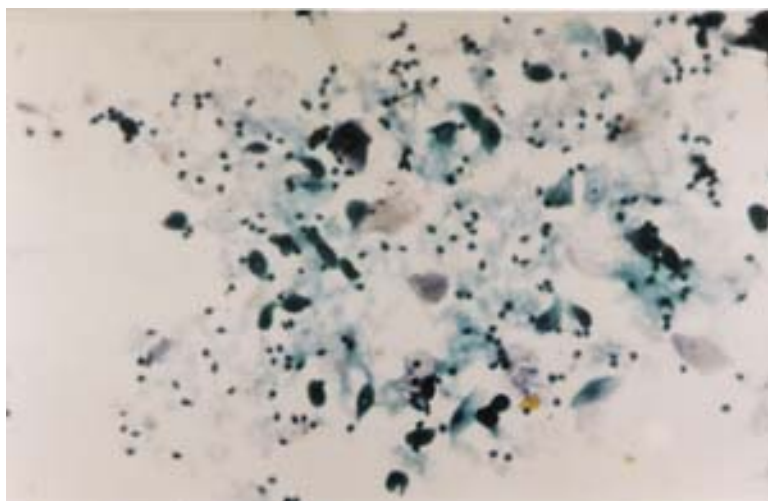


FIGURA 7 – Diestro precoce (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

A fase diestro (D) apresentou-se com manutenção da infiltração leucocitária acompanhada de um leve decréscimo na celularidade. Observa-se um predomínio de células superficiais mal conservadas e de baixa cromoafinidade, mas a presença de profundas e intermediárias ainda se evidencia (Figura 8).

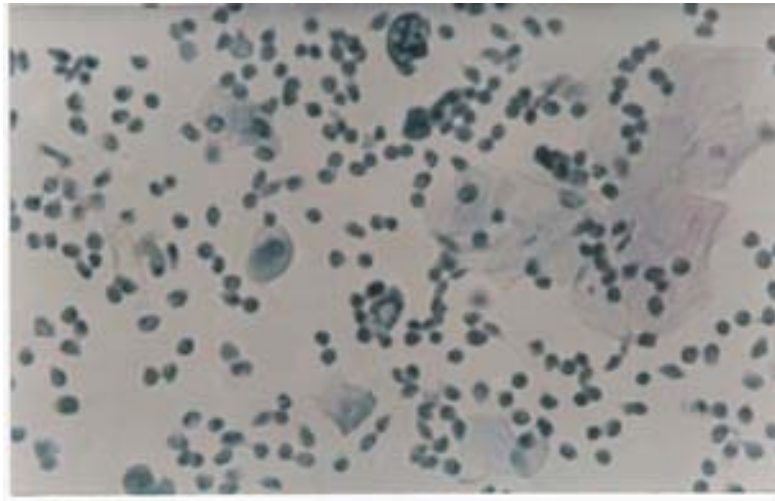


FIGURA 8 – Diestro (200 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

O diestro tardio (DT) mostrou-se relativamente raro e com pouco material celular o que dificultou sua identificação; apresentou uma quantidade reduzida de leucócitos, mas com uma certa proporcionalidade entre os tipos celulares.

As etapas referentes ao diestro se mostram, hoje, condensadas em uma única fase, onde possuem em comum a baixa celularidade, maturação e presença marcante de leucócitos e material degenerados. No entanto, a proporção entre os tipos celulares mostra-se dispar e, como será exposto posteriormente, levaria a dificuldade em uma caracterização quantitativa por meio de índices citológicos.

A etapa seguinte, o estro precoce (EP), caracterizou-se pela presença pouco expressiva de leucócitos degenerados e abundância de células nucleadas,

sobretudo profundas (Figura 9). No entanto, algumas observações mostraram um aspecto de transição entre o EP e E com uma quantidade marcante de superficiais em proporção similar a de profundas; mas a baixa frequência deste evento não seria suficiente para delimitação de uma sétima fase.



FIGURA 9 – Estro precoce (400 x, coloração adaptada de Papanicolaou) . FONTE: dados de pesquisa.

A Tabela 3 sintetiza os achados peculiares a cada fase do ciclo. Não houve dificuldades na caracterização destas fases segundo a descrição da literatura. Outros elementos figurados como muco e flora se mostraram de forma mais exuberante nas fases diestrals, não havendo particularidades sobre os mesmos em uma fase específica.

TABELA 3 – Síntese dos achados citológicos característicos a cada fase do ciclo em relação ao tipo celular predominante e quantidade de material (celularidade) quando usada a técnica policromática de coloração. Natal, RN.

Fases do ciclo	Tipo celular			
	Células epiteliais nucleadas	Células epiteliais anucleadas	Leucócitos	Celularidade
	E	0	+++	0
ET	0	+++	0 a +	Alta
DP	+ a ++	+	++ a +++	Moderada
D	+ a ++	0	+ a +++	Baixa
DT	+	+	+ a ++	Baixa
EP	+++	+	0 a +	Alta

FONTE: dados de pesquisa

Legenda: 0 = ausência, + = escasso, ++ = moderado e +++ = abundante

Na Figura 10, obtida do artigo de Mandl (1951), observa-se um apanhado das classificações citológicas utilizadas por trabalhos clássicos sobre o tema. Nota-se certa divergência na delimitação das fases, sobretudo no que se refere ao perímetro temporal ovulatório; ou seja, as características citológicas na proximidade do estro apresentam maior dificuldade classificatória. No entanto, a autora salienta a compatibilidade estatística entre a duração das fases (em horas) equivalentes nos diferentes estudos. Ou seja, existia um consenso para estes autores em relação a um período do ciclo, denominado diestral, o qual seria caracterizado por baixa maturação e presença de leucócitos correspondendo a cerca de metade da duração do ciclo. Em contrapartida, o período estral, de maior celularidade, maturação e escassez de leucócitos teria um perfil marcadamente distinto equivalente a outra metade. A nomenclatura utilizada por Mandl (1951) e proposta por Astwood (1939) mostrou-se a mais sucinta e de melhor adequação ao nosso estudo.

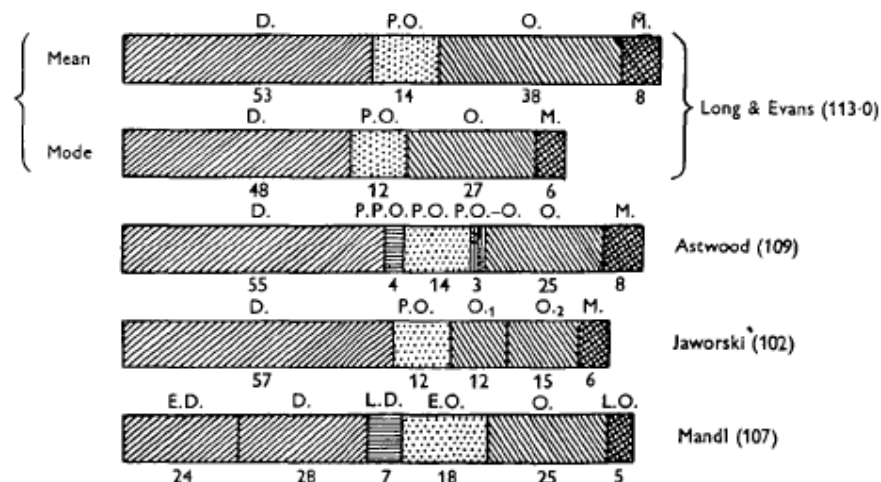


FIGURA 10 – Duração relativa das fases do ciclo estral. E.D. = diestro precoce; D. = diestro; L.D. = diestro tardio; E.O. = estro precoce; P.P.O. = pré -estro; P.O. = pró-estro; O. = estro; L.O. = estro tardio; M. = metaestro.

FONTE: MANDL, 1951.

TABELA 4 – Frequência relativa das fases do ciclo em horas segundo a classificação de ASTWOOD apud MANDL (1951) nos grupos experimentais e em alguns trabalhos da literatura.

Fases do ciclo	Frequência relativa das fases do ciclo em horas			
	Grupo I *	Grupo II *	MANDL (1951)	NELSON (1982)
E	22,0 ± 3,4	21,0 ± 4,1	25	23,0 ± 3,9
ET	4,1 ± 2,8	4,4 ± 3,2	5	4,8 ± 1,8
DP	28,0 ± 7,5	29,1 ± 8,2	24	27,0 ± 4,2
D	36,0 ± 3,7	35,3 ± 2,9	28	32,2 ± 5,1
DT**	3,6 ± 3,1	1,0 ± 1,9	7	5,6 ± 2,9
EP	22,0 ± 3,0	18,9 ± 3,3	18	20,5 ± 4,3

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

** Diferença estatisticamente significativa entre os grupos I e II ($p < 0,05$).

A Tabela 4 mostra a duração média de cada fase em nosso estudo, como também os dados presentes nos trabalhos de Mandl (1951) e Nelson (1982).

Apesar da impossibilidade de um tratamento estatístico mais aprimorado entre os nossos dados e o da literatura; observa-se uma aparente compatibilidade. Faz-se uma ressalva somente em relação à duração do diestro

tardio o qual se mostrou com valores conflitantes intergrupos e também quando comparado aos trabalhos citados. A dificuldade na sua identificação, além da sua baixa frequência seriam as razões para estas discrepâncias.

A reprodutibilidade dos resultados em momentos distintos do trabalho; as concordâncias com o relatado na literatura em relação à duração do ciclo e das suas fases apontaram para adequabilidade da técnica de coleta, coloração e análise do ciclo estral murino desenvolvida neste estudo. Ou seja, a observação das amostras do ponto de vista qualitativo, mostrou-se eficaz.

A Tabela 5 apresenta os índices maturativos em cada fase do ciclo, iniciando a caracterização citológica quantitativa dos dados em valores percentuais relativos.

TABELA 5 – Índice maturativo obtido em cada fase do ciclo apresentando a proporção relativa percentual das células profundas, intermediárias e superficiais. Natal, RN.

Fases do ciclo	Índice Maturativo (%)					
	Grupo I			Grupo II		
	P	I	S	P	I	S
E	1,0 ± 0,5	2,3 ± 2,5	96,7 ± 6,2	0,6 ± 1,2	4,8 ± 5,5	94,6 ± 6,2
ET	5,5 ± 3,2	10 ± 6,6	84,5 ± 7,2	7,0 ± 11,2	18 ± 10,6	75 ± 12,2
DP	57,3 ± 4,0	19,3 ± 7,5	23,4 ± 8,4	57,3 ± 15,0	21,2 ± 9,5	21,5 ± 12,4
D	29,0 ± 11,6	19,6 ± 6,4	51,4 ± 8,1	19,8 ± 12,6	18,8 ± 7,4	61,4 ± 16,1
DT	33,1 ± 14,5	28,7 ± 21,4	38,2 ± 17,7	37,3 ± 11,1	24,7 ± 19,4	38,0 ± 18,4
EP	70,3 ± 9,1	14,7 ± 7,4	15,0 ± 8,8	68,3 ± 13,4	14,4 ± 6,9	17,3 ± 12,6

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de maturação, entre as fases nos dois grupos ($p < 0,05$).

O percentual relativo dos tipos celulares em cada fase do ciclo observados na Tabela 5 é concordante com a descrição qualitativa das mesmas. O estro mostra-se predominantemente tomado por células superficiais na quase

totalidade (acima de 95%); na fase seguinte (ET) ocorre um declínio nestas células para em seguida efetua-se uma inversão na próxima fase (DP). O diestro apresenta uma aparente contradição, pois mostra um aumento de células superficiais quando a tendência do ciclo neste ponto seria a baixa maturação. Isto pode ser explicado por se tratar de um momento de baixíssima proliferação celular; logo as células superficiais de baixa cromofinidade (indicativo de descamação tardia) presentes são resquícios de outras fases e não refletem necessariamente as condições do tecido; a lavagem vaginal carrearia um número maior de células descamadas espontaneamente em detrimento do epitélio pouco maduro e compactado presente. O DT é a fase que mais se aproxima de um equilíbrio percentual entre os tipos celulares, mas mostra ainda muita semelhança com a fase anterior levando a uma certa dificuldade na sua diferenciação. Tanto o D quanto o DT se mostraram esfregaços de difícil quantificação pela baixa quantidade de material. O EP mostra um alto caráter proliferativo, com marcante presença de profundas em um esfregaço limpo de leucócitos e de fácil quantificação. Não houve diferença significativa estatisticamente entre os percentuais celulares nos dois grupos avaliados.

O índice de Meisler descreve com maior objetividade os dados acima como podemos observar na Figura 11 e Tabela 6. Valores próximos de 100 indicam maturação elevada, enquanto valores menores apontariam para pouca maturidade e conseqüente predomínio de células profundas e intermediárias.

TABELA 6 – Índice maturativo de Meisler nos grupos I e II. Natal, RN.

Índice de Meisler (%)*		
Fases do ciclo	Grupo I	Grupo II
E	97,9 ± 3,1	97,0 ± 4,3
ET	89,5 ± 5,7	84,0 ± 11,3
DP	33,1 ± 6,6	32,1 ± 12,3
D	61,2 ± 8,7	70,8 ± 12,0
DT	52,6 ± 17,9	50,35 ± 16,3
EP	22,4 ± 8,4	24,5 ± 11,0

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de Meisler entre os dois grupos ($p < 0,05$).

Graficamente, observa-se uma queda acentuada da maturação no DP e uma aparente elevação nas duas fases seguintes, outro declínio antecedendo ao estro e a maturação máxima neste (Figura 11).

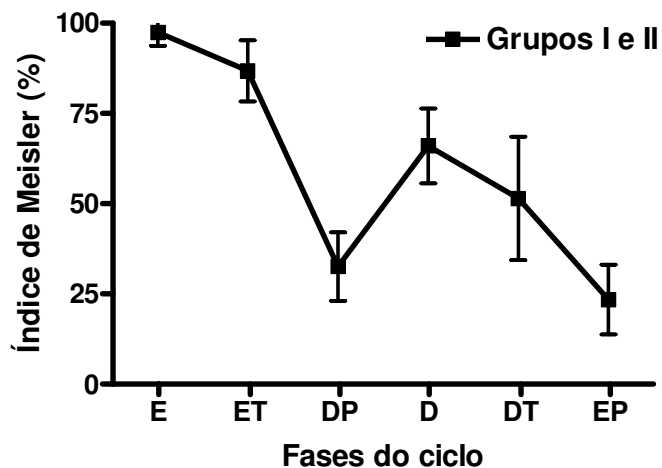


FIGURA 11 – Média e desvio padrão dos valores de Meisler para os grupos I e II.

FONTE: dados de pesquisa.

Como dito anteriormente, o objetivo deste momento do trabalho seria o conhecimento da dinâmica celular murina frente ao observado na literatura. Constatou-se a adequabilidade das condições experimentais que levaram a dados reprodutíveis e compatíveis com artigos clássicos sobre o tema. O conhecimento dos caracteres celulares, a delimitação da extensão e fases do ciclo, bem como a descrição quantitativa destas foi possível com a técnica desenvolvida. No entanto, a coloração policromática utilizada apresenta um inconveniente relativo ao tempo gasto no processo de fixação, coloração e montagem; isto implicaria em uma restrição ao tamanho do grupo experimental avaliado. Vale também ressaltar o número excessivo de etapas envolvidas no processo, culminando na presença de artefatos de coloração, dificuldade na manutenção dos reagentes envolvidos e seu custo. Em vista disto, o passo seguinte no trabalho se propôs ao desenvolvimento de uma técnica simplificada, com menor custo e tempo de execução como forma de viabilizar um número maior de amostras em um tempo compatível com a característica diária do experimento.

5.2 Estudo Citológico Secundário

Nesta etapa do estudo, o principal intuito seria o uso de uma técnica mais dinâmica que permitisse a avaliação de maior número de amostras em menos tempo. Esta técnica deveria manter a especificidade para caracterização do ciclo observada na etapa anterior; utilizando uma coloração monocromática de menor custo e maior praticidade.

As condições de manejo dos espécimes, assim como a coleta do material foram mantidas nesta etapa. A Tabela abaixo descreve as características do grupo utilizado e o confronto com os grupos anteriores.

TABELA 7 – Descrição do grupo experimental avaliado em relação a peso e idade, duração do ciclo estral e quantidade de ciclos e sua comparação com os dados obtidos na etapa anterior do estudo. Natal, RN.

	Grupo III	Grupo I & II
Número	25	30
Peso (g)*	193,1 ± 31,9	188,7 ± 29,4
Idade (dias)*	91,7 ± 24,3	100,15 ± 23,6
Perdas	3	2
Ciclo (dias)*	4,9 ± 0,4	4,7 ± 0,9
Ciclos avaliados	124	133

FONTE: dados de pesquisa.

* Valores em média e desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis peso, idade, perdas e duração do ciclo entre os dois grupos ($p < 0,05$).

Apesar da mudança no processamento citológico do material, não houve diferença estatisticamente significativa na delimitação da extensão do ciclo.

O corante Azul de Evans (AE) é um composto orgânico polibenzênico com pontes diazo, apresentando grupamentos aminados e sulfonas e possuindo elevada solubilidade em água (Figura 12). Em pH ácido (4 – 5) mostra intensa ionização e aumento de hidrofília (MERCK..., 1989), além de acentuada inocuidade biológica (GEHLEN et al, 2004). A solução corante de AE mostrou-se com pH aproximado de 4,3 o que associada a sua elevada solubilidade teoricamente possibilitaria uma boa cromoafinidade nuclear.

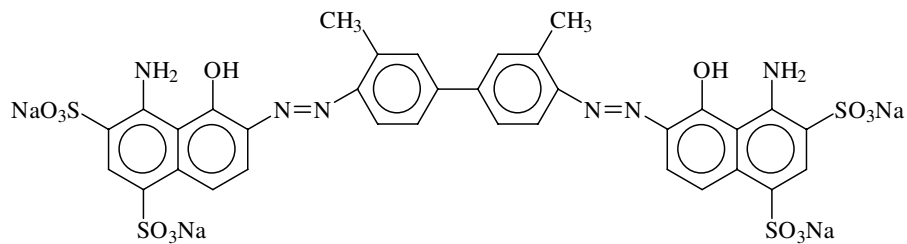


FIGURA 12 – 6,6'- [3,3'- dimetil (1,1'- bifenil) – 4,4'- deil] bis (azo) - bis - (4 - amino - 5 - hidróxi) - 1,3 - naftalenodisulfônico ácido; sal tetrasódico (C₃₄H₂₄N₆O₁₄Na₄, PM = 960,842).
Index color 2005: 23860, direct blue 53.
FONTE: MERCK..., 1989.

Nos tecidos, há grupos carregados eletricamente, principalmente COO⁻ e NH₃⁺ abundantes nas estruturas protéicas. A ionização dos grupos carboxilas e aminas dependem em parte do pH. Num pH ácido, os grupos aminas são mais ionizados e em um pH alcalino, os grupos carboxilas são ionizados e os demais suprimidos. Na vigência de um pH tecidual específico, os sais ácidos ou alcalinos de um cromogênio particular têm afinidade por estruturas celulares relativamente alcalinas ou ácidas, respectivamente (CARVALHO, RECCO-PIMENTEL, 2001).

As células de maior maturidade e queratinização mostraram menor cromoafinidade pelo AE, enquanto que a presença de material nuclear mostrou intensa cianofilia pelo corante de acordo com o esperado. As células superficiais apresentaram uma leve reatividade ao corante; nas intermediárias conseguiu-se clara delimitação entre núcleo de azul intenso e citoplasma claro; enquanto que as profundas revelaram uma acentuada cianofilia com pouca distinção entre núcleo e citoplasma (Figura 13). O formato celular não se mostrou muito diverso do descrito no estudo primário, novamente houve uma certa diversidade quanto as intermediárias.

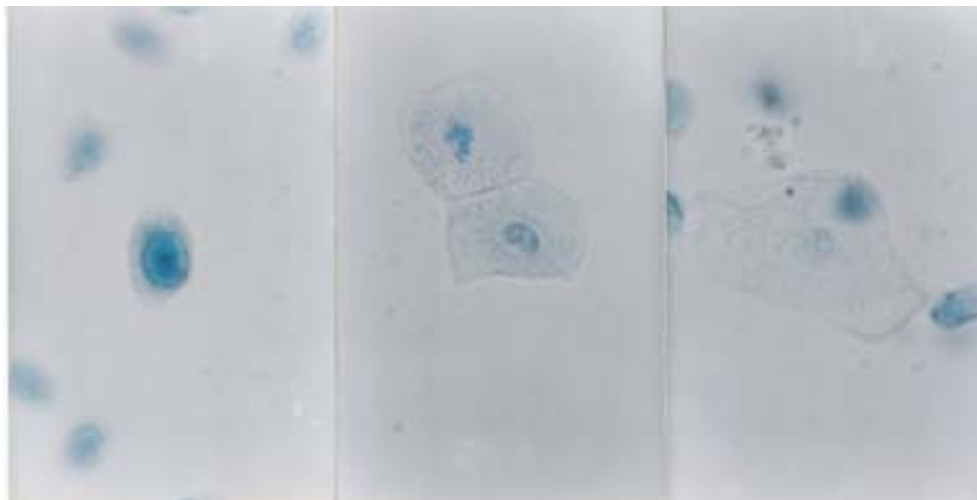


FIGURA 13 – Células profundas de formato esférico e núcleo volumoso intensamente cianófilo; intermediárias de maior extensão e menor cromoafinidade nuclear e citoplasmática; e células superficiais anucleadas e transparentes. FONTE: dados de pesquisa.

Apesar da leve fixação empregada (etanol 50%) não houve alteração significativa nos caracteres citomorfológicos como se evidencia na Tabela acima; o pequeno aumento de volume nas intermediárias pode ser atribuído à hidratação citoplasmática.

O processo de maturação celular incrementa a quantidade de proteínas sulfatadas no citoplasma celular, sobretudo a queratina de baixa polaridade (LAMB, 1978). Conseqüentemente, células superficiais apresentariam queratinização acentuada ao contrário das profundas. Esta característica se mostrou importante em nosso estudo, pois levou à busca de uma técnica que se valesse desde gradação maturativa: aumento dos níveis de queratina rica em grupamentos básicos associada à perda de material ácido nuclear. A escolha do AE atendeu aos critérios de alta solubilidade em água, inocuidade e acidofilia; possibilitando uma cromoafinidade seletiva a presença de núcleo e baixos níveis de queratina. Em suma, as células superficiais apresentaram uma tonalidade débil

à microscopia por não terem quantidade significativa de material nuclear ácido e por excesso de queratina básica e apolar.

A cromoafinidade seletiva proporcionada pelo AE possibilitou, na opinião dos autores, uma identificação mais rápida e segura das fases do ciclo quando comparado à técnica a fresco descrita por Marcondes e colaboradores (2002).

A análise do estro ainda revelou a acentuada celularidade superficial vista na etapa primária desse estudo, mas células intermediárias se mostraram mais presentes. O esfregaço apresentou uma tênue cianofilia e não houve dificuldades técnicas na sua identificação (Figura 14).

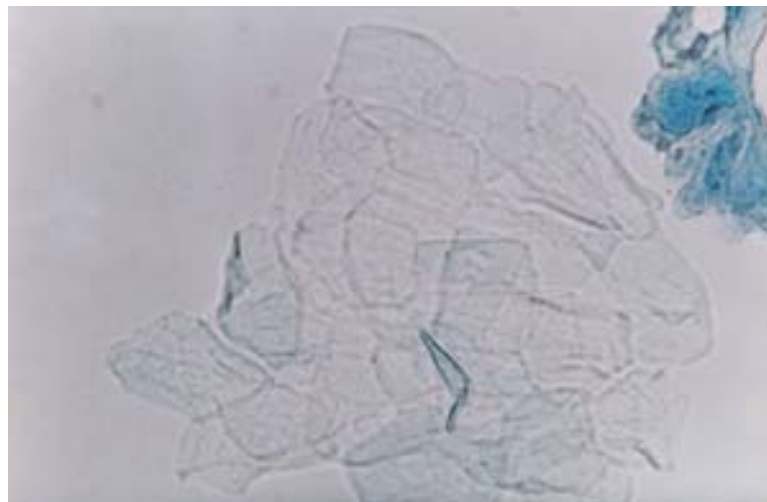


FIGURA 14 – Estro (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa.

O estro tardio (Figura 15), a exemplo do que foi visto anteriormente, apresentou características similares ao E diferindo em uma menor celularidade e a presença de leucócitos bem conservados.



FIGURA 15 – Estro tardio (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa.

No diestro precoce houve uma menor quantidade de células com esta técnica, ainda revelando a presença predominante de infiltração leucocitária em relação às células epiteliais com baixa presença de superficiais (Figura 16).

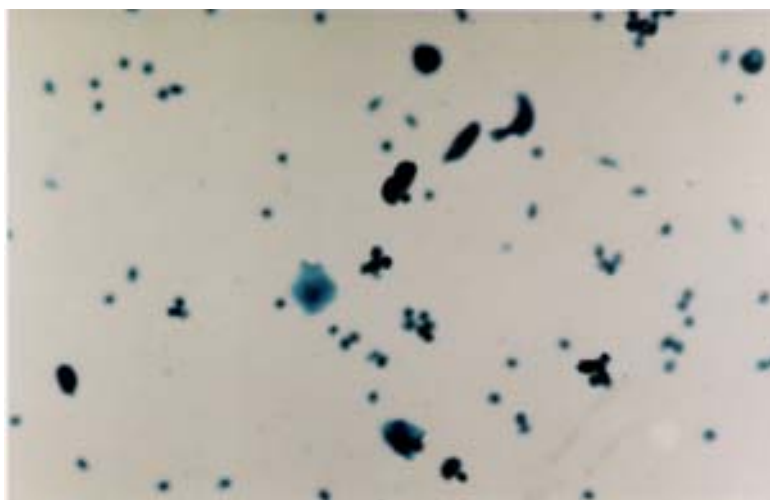


FIGURA 16 – Diestro precoce (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa.

A fase diestro mostrou-se muito escassa e com uma presença relativa maior de superficiais (Figura 17), a intensidade da infiltração leucocitária declinou e algumas coletas resultaram em material insuficiente para avaliação no período correspondente a esta fase.

O diestro tardio (DT) não foi visualizado com esta técnica.

A etapa seguinte, o estro precoce (EP), caracterizou-se pela presença pouco expressiva de leucócitos degenerados e abundância de células nucleadas, sobretudo profundas (Figura 18) e mostrou-se de fácil caracterização.



FIGURA 17 – Diestro (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa.

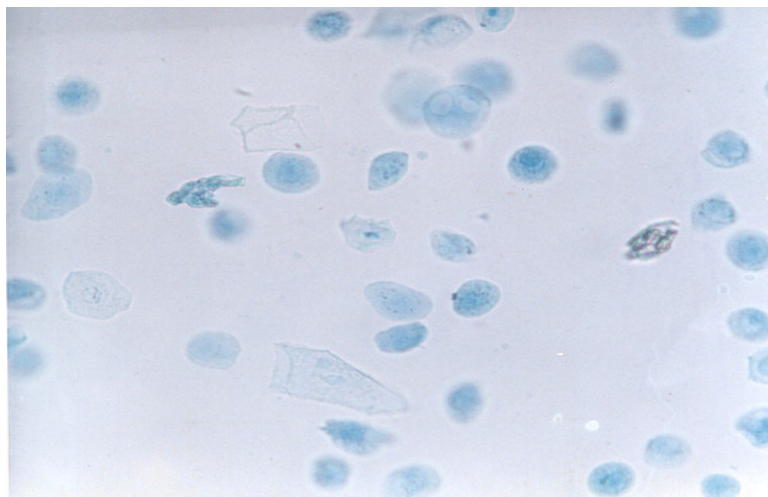


FIGURA 18 – Estro precoce (200 x, coloração com azul de Evans) . FONTE: dados de pesquisa.

Houve menor uniformidade na distribuição do esfregaço, como também um aumento na sobreposição celular; no entanto não houve comprometimento na observação das amostras. A citocentrifugação permitia melhores características na disposição das células a qual foi comprometida com a macrocentrifugação; sem, no entanto, ocasionar amostras com material insuficiente para análise.

A Tabela 8 sumariza os achados citológicos encontrados nesta fase experimental. Atenta-se para a não caracterização do DT e uma intensidade menor de presença leucocitária no diestro. Nas demais fases, não existiram dificuldades na identificação.

A Tabela 9 mostra a duração relativa de cada fase do ciclo, comparando a técnica monocromática do AE com a desenvolvida anteriormente de caráter policromático.

TABELA 8 – Síntese dos achados citológicos característicos a cada fase do ciclo em relação ao tipo celular predominante e quantidade de material (celularidade) quando usada a técnica monocromática de coloração. Natal, RN.

Fases do ciclo	Tipo celular			
	Células epiteliais nucleadas	Células epiteliais anucleadas	Leucócitos	Celularidade
	E	0	+++	0
ET	0	+++	0 a +	Alta
DP	+ a ++	+	++	Moderada a baixa
D	+ a ++	+	+	Baixa
DT	NO	NO	NO	NO
EP	+++	+	0 a +	Alta

FONTE: dados de pesquisa.

Legenda: 0 = ausência, + = escasso, ++ = moderado, +++ = abundante e NO = não observado.

TABELA 9 – Freqüência relativa das fases do ciclo em horas segundo a classificação de Astwood apud Mandl (1951) com a técnica policromática de Papanicolaou (grupo I & II) e a monocromática com AE (grupo III). Natal, RN.

Fases do ciclo	Freqüência relativa das fases do ciclo em horas (%)*	
	Grupo III	Grupo I & II
E	23,0 ± 2,9	21,5 ± 3,8
ET	4,8 ± 3,4	4,3 ± 3,0
DP	26,9 ± 8,1	28,6 ± 7,9
D	34,7 ± 6,3	35,7 ± 3,3
DT**	0,0 ± 0,0	2,3 ± 2,5
EP	21,6 ± 2,9	20,5 ± 3,2

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

** Diferença estatisticamente significativa entre os grupos III e I & II (p < 0,05)

As técnicas de coloração desenvolvidas neste estudo mostram algumas peculiaridades a serem confrontadas. A fixação mais acentuada da técnica primária (item 4.1.2) em contraposição a menor desidratação da segunda descrita no item 4.2.2, cada uma adaptada à natureza dos corantes a serem utilizados posteriormente, não levou a alterações citomorfológicas importantes. A coloração em ambas as técnicas seria utilizada para evidenciar o tipo celular pela sua forma

e aspectos maturativos, conseqüentemente levando a caracterização da fase correspondente àquela observação. As duas alcançaram esta finalidade, pois não se observa diferença estatisticamente significativa em relação à extensão do ciclo (Tabela 7) e das fases (Tabela 9) em grupos avaliados pelas duas técnicas, com exceção do diestro tardio. Esta fase mostrou-se de difícil caracterização em ambas as técnicas; na primeira metodologia não houve reprodutibilidade intergrupos e na segunda, não houve visualização. Isto se deve provavelmente a sua baixa celularidade e freqüência.

Conclui-se que as técnicas desenvolvidas mostram compatibilidade com os resultados observados na literatura em relação à caracterização qualitativa do ciclo estral murino.

Quantitativamente o ciclo é descrito através de índices maturativos a seguir.

Na Tabela 10, observa-se uma tendência à diminuição do percentual de células superficiais em todas as fases do grupo III, mesmo não se revelando diferença estatística entre os grupos. O tipo de concentração da amostra executada na técnica monocromática aparentemente pode ter se mostrado deficiente no tocante a células de menor densidade como as superficiais; isso explicaria sua menor presença. O índice de Meisler também mostrou valores sensivelmente menores, refletindo o exposto (Tabela 11 e Figura 19); mas novamente não revelou diferença entre as técnicas.

TABELA 10 – Índice maturativo obtido em cada fase do ciclo apresentando a proporção relativa percentual das células profundas, intermediárias e superficiais quando utilizada a técnica monocromática.

Fases do ciclo	Índice Maturativo (%)*					
	Grupo III			Grupo I & II		
	P	I	S	P	I	S
E	1,1 ± 2,1	7,8 ± 5,3	91,1 ± 3,4	0,8 ± 0,9	3,6 ± 4,0	95,7 ± 6,2
ET	7,0 ± 9,8	19,9 ± 9,1	73,1 ± 12,2	6,3 ± 7,2	14,0 ± 8,6	79,8 ± 9,7
DP	60,1 ± 14,1	24,3 ± 10,0	15,6 ± 13,7	57,3 ± 9,5	20,3 ± 8,5	22,5 ± 10,4
D	20,4 ± 9,8	19,1 ± 7,8	60,5 ± 8,6	24,4 ± 12,1	19,2 ± 6,9	56,4 ± 12,1
DT**	NO	NO	NO	35,2 ± 12,8	26,7 ± 20,4	38,1 ± 18,1
EP	72,2 ± 14,1	14,6 ± 7,0	13,2 ± 14,3	69,3 ± 11,3	14,6 ± 7,2	16,2 ± 10,7

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

** Não avaliado estatisticamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de maturação entre os dois grupos ($p < 0,05$).

Legenda: NO = não observado, P = profunda, I = intermediária e S = superficial.

TABELA 11 – Índice maturativo de Meisler com a técnica policromática de Papanicolaou (grupo I & II) e a monocromática com AE (grupo III). Natal, RN.

Fases do ciclo	Índice de Meisler (%)*	
	Grupo III	Grupo I & II
E	95,0 ± 3,6	97,4 ± 3,7
ET	83,1 ± 10,4	86,8 ± 8,5
DP	27,8 ± 12,6	32,6 ± 9,5
D	70,5 ± 8,7	66,0 ± 10,4
DT**	NO	51,5 ± 17,1
EP	20,5 ± 11,8	23,4 ± 9,7

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

** Não avaliado estatisticamente.

Não houve diferença estatisticamente significativa para os valores de Meisler entre os dois grupos ($p < 0,05$).

Graficamente observou-se o mesmo comportamento em ambas, ou seja, observa-se uma queda acentuada da maturação no DP e uma aparente elevação nas duas fases seguintes, outro declínio antecedendo ao estro e a maturação máxima neste (Figura 19).

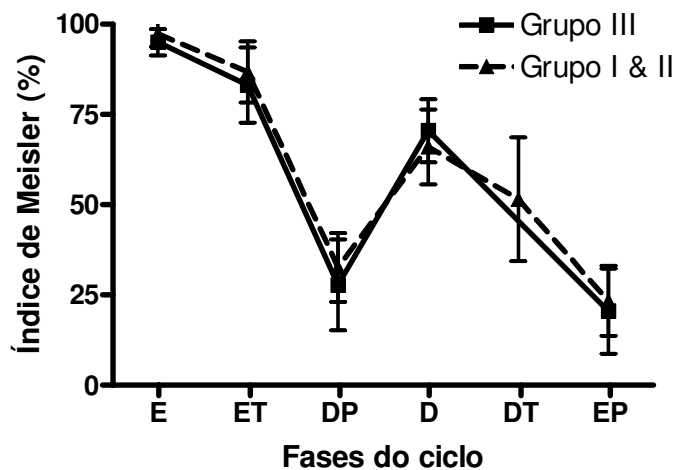


FIGURA 19 – Média e desvio padrão dos valores de Meisler para os grupos III e I & II.
 FONTE: dados de pesquisa.

A técnica monocromática mostrou-se de maior praticidade, menor custo e bem menos demorada. Qualitativamente apresentou eficácia similar a encontrada com o uso da coloração de Papanicolaou; no entanto, apesar de ambas se valerem de um processamento em meio líquido levando a esfregaços uniformes, não sobrepostos e com poucos artefatos, a análise quantitativa mostrou menor dispersão na primeira técnica.

5.3 Administração dos fármacos hormonioterápicos

A Tabela 12 abaixo mostra as condições iniciais dos animais submetidos a administração dos fármacos em estudo e observa-se compatibilidade em relação a peso e idade nos grupos avaliados.

TABELA 12 – Descrição dos grupos experimentais antes da administração dos fármacos hormonioterápicos. Natal, RN.

	CON	TAM	EXE	ANA
Número	08	08	08	08
Peso (g)*	177,7 ± 16,2	181,4 ± 20,4	190,0 ± 23,5	184,9 ± 31,0
Idade (dias)*	93,7 ± 21,8	84,6 ± 24,1	90,1 ± 18,9	102,8 ± 12,5

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis peso e idade entre os grupos ($p < 0,05$).

Legenda: CON = controle, TAM = tamoxifeno, EXE = exemestano e ANA = anastrozol.

O veículo desenvolvido apresentou boas características farmacotécnicas; mostrou-se uma suspensão estável sem formação de precipitados e/ou grumos, como também alteração de cor ou odor. O volume diário administrado foi cerca de 0,2 mL, não havendo dificuldades no processo aparentemente com boa aceitação por parte dos animais. Não se observou efeito colateral significativo, com exceção do grupo que recebeu exemestano onde se apresentou um leve quadro diarréico nos animais.

De Gregorio et al (1987), após estudos em ratos sobre vias de administração e equivalência de doses, postularam que 40 µg/kg de tamoxifeno ao dia pela via oral resultaria em níveis séricos similares ao de mulheres com uso diário de 20 mg. Outro estudo aponta a concentração de 30 µg/kg/dia como isenta de toxicidade em um prazo de 28 dias (KENNEL et al, 2003). Logo, a administração de 0,02 mg de tamoxifeno por kg de massa animal levaria a níveis não tóxicos.

Outro trabalho com objetivos similares, mas sobre o anastrozol, foi desenvolvido por Dukes et al em 1996. Este estudo mostrou que a administração por gavagem do fármaco a 0,001 mg por kg de animal também resultaria em

níveis séricos próximos a margem terapêutica humana; sendo esta concentração a utilizada em nosso trabalho.

O exemestano mostra inibição da enzima aromatase murina em níveis compatíveis aos observados terapeuticamente em humanos quando o animal é submetido a cerca de 0,02 mg/kg (Brugueras 2004 apud Goss 2004).

O TAM é potente hepatocarcinógeno em ratos, tanto nos machos quanto nas fêmeas (GREAVES et al., 1993; WILLIAMS, 2001), como também é indutor de adenocarcinoma uterino em camundongos e ratos neonatos tratados e está relacionado a fenômenos tromboembólicos (CARTHEW et al., 2000). O exemestano foi associado, em alguns estudos com modelos animais, com a elevação de triglicérides e o anastrozol levou a insuficiência renal sob administração crônica em ratos (BUZDAR, 2003).

A administração dos fármacos visando o limiar da concentração terapêutica, teria o intuito de evitar a interrupção brusca do ciclo o que inviabilizaria sua caracterização citológica. Os autores citados anteriormente para este objetivo (Brugueras 2004 apud Goss, 2004; De Gregorio et al, 1987; Dukes et al, 1996) relataram também a não ocorrência de alterações histomorfológicas comprometedoras das funções orgânicas em fígado, coração e rins nos animais tratados nestas concentrações.

Ao final do período de administração dos fármacos, não foram observados sinais evidentes de toxicidade, ressaltando apenas o quadro diarréico leve, como citado anteriormente, em alguns animais do grupo EXE. A Tabela abaixo apresenta alguns analitos relativos a parâmetros de atividade renal, perfil lipídico e hepático.

TABELA 13 – Concentrações séricas de glicose, uréia , creatinina, colesterol, triglicérides, TGO e TGP nos grupos avaliados. Natal, RN.

	*CON	*TAM	*EXE	*ANA	Referência**
Glicose mg/dL	62,4 ± 34,2	71,1 ± 25,5	61,3 ± 15,9	80,1 ± 41,0	50 – 135
Uréia mg/dL	17,3 ± 4,8	11,4 ± 7,3	19,1 ± 8,2	17,5 ± 3,0	5 – 29
Creatinina mg/dL	0,4 ± 0,9	0,7 ± 0,4	0,5 ± 0,6	0,5 ± 0,7	0,2 – 0,8
Colesterol mg/dL	29,5 ± 16,4	32,7 ± 10,1	23,9 ± 21,7	29,0 ± 19,2	10 – 54
Triglicérides mg/dL	41,0 ± 30,2	60,0 ± 28,9	54,7 ± 20,0	50,3 ± 17,8	> 70
TGO U/L	57,9 ± 24,3	67,1 ± 20,5	61,4 ± 12,1	55,2 ± 14,9	45,7 – 80,8
TGP U/L	21,7 ± 14,6	32,7 ± 17,2	29,4 ± 13,5	23,8 ± 15,5	17,5 – 30,2

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão. ** MITRUKA, B.M. & RAWNSLEY, H.M. Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals. New York: Masson Publishing, 1977.

Não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis apresentadas entre os grupos ($p < 0,05$).

Legenda: TGO = alanina amino transferase, TGP = aspartato amino transferase, CON = controle, TAM = tamoxifeno, EXE = exemestano e ANA = anastrozol.

Um possível dano hepático e/ou renal poderia acarretar alterações na cinética dos fármacos e conseqüente resposta idiossincrática. No entanto, a literatura associa estas ocorrências a concentrações bem maiores e por tempos mais prolongados das utilizadas neste estudo. Logo, os dados da Tabela 13 sugerem a presença não significativa destes eventos nos grupos analisados, já que estes não diferiram do controle.

Durante o período de administração dos fármacos, atentou-se primeiramente para alterações na duração total do ciclo, com aumento apreciável em todos os grupos em relação ao controle, como mostrado na Figura 20.

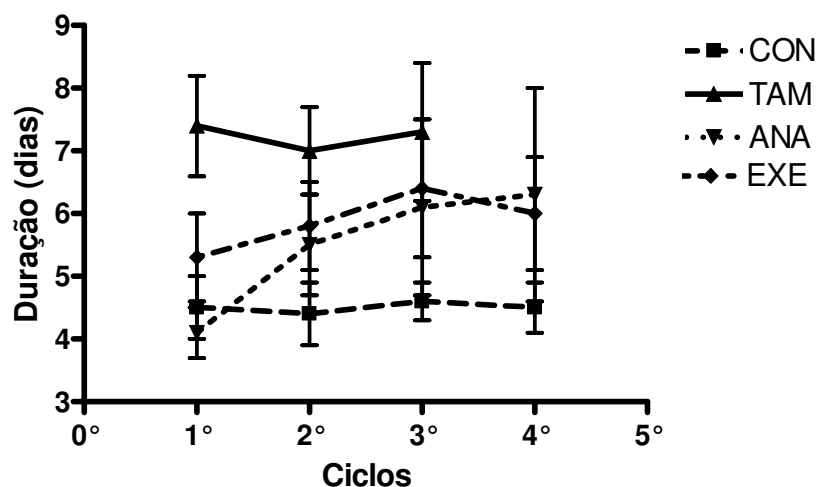


FIGURA 20 – Duração em dias dos ciclos nos grupos tratados (valores em média e desvio padrão). TAM: $p < 0,05$ a partir do 1° ciclo em relação ao controle, ANA: $p < 0,05$ a partir do 3° ciclo em relação ao controle e EXE: $p < 0,05$ a partir do 2° ciclo em relação ao controle.

FONTE: dados de pesquisa.

O TAM incrementou a duração do ciclo de forma mais imediata, com uma diferença de 4,5 dias do grupo controle para 7,2 dias; enquanto que os inibidores da aromatase apresentaram um perfil de alargamento do ciclo mais gradativo como se observa no gráfico acima e não tão acentuado (aproximadamente 6,2 dias para ambos).

O TAM pode ter um efeito estrogênico parcial ou antiestrogênico a depender do tecido alvo e da espécie em estudo (JORDAN, 1995). Experimentalmente, ratos submetidos a longos períodos de administração de TAM apresentam, inicialmente, proliferação endometrial e vaginal intensa seguida de falência do crescimento destes órgãos e atrofia uterina (WHITE, 1999).

O grupo submetido ao TAM apresentou uma maturação lentificada revelada pela duração maior da fase DP, caracterizada pela baixa presença de

células superficiais e abundância de células imaturas (Figura 21). Associado a este evento, observou-se um padrão proliferativo com maior riqueza celular nos esfregaços deste grupo. Ou seja, tamoxifeno induziu um estado de maturação lenta e alta proliferação.

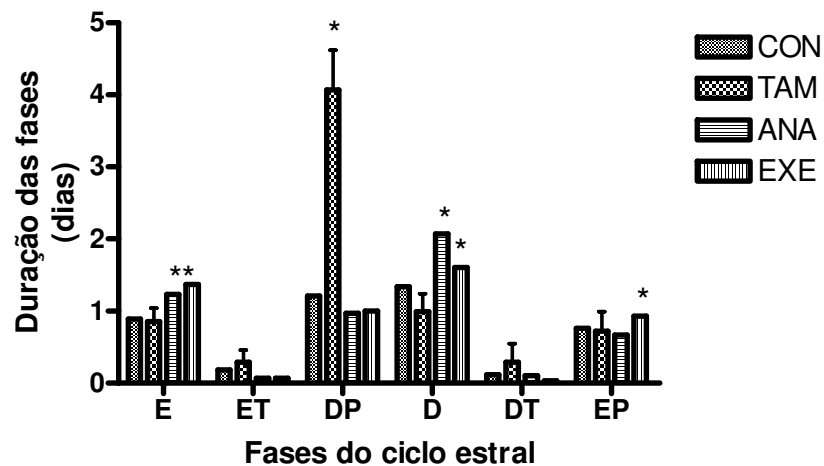


FIGURA 21 – Duração das fases em dias nos grupos experimentais. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle (ANOVA, $p < 0,05$).
 FONTE: dados de pesquisa.

Os inibidores da aromatase apresentaram incremento na duração das fases de maior caráter maturativo (elevados valores de Meisler nas fases E, D e EP) o que, a princípio, pareceria conflitante, já que se esperaria um comportamento atrófico do epitélio pela ausência de estrógenos. No entanto, a diminuição inicial destes compostos pela ação inibitória sobre a aromatase leva à interrupção do *feedback* negativo atuante na hipófise adrenal (DUKES, 1997; SANTEN, SAMOJLIK, WELLS, 1980). Ocorre aumento dos níveis de hormônios

luteinizantes (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), o primeiro estimula o ovário a secretar mais androstenodiona, substrato da aromatase, e o FSH aumenta a expressão desta enzima (SIMPSON et al, 1994; SINHA et al, 1998). Desta forma os animais tratados com EXE e ANA revelaram aumento significativo na extensão das fases de alta maturação.

Observa-se um perfil discrepante entre o TAM e os inibidores da aromatase no tocante a extensão das fases do ciclo; pois o primeiro induz a uma maturação mais lenta, enquanto que os inibidores acentuam as fases caracterizadas pela predominância de células superficiais. No entanto, não foi demonstrado diferença estatística quando confrontados os valores dos grupos ANA e EXE.

O confronto entre os valores de IM obtidos de cada grupo, mostra um comportamento ainda bem menos discrepante (Figura 22).

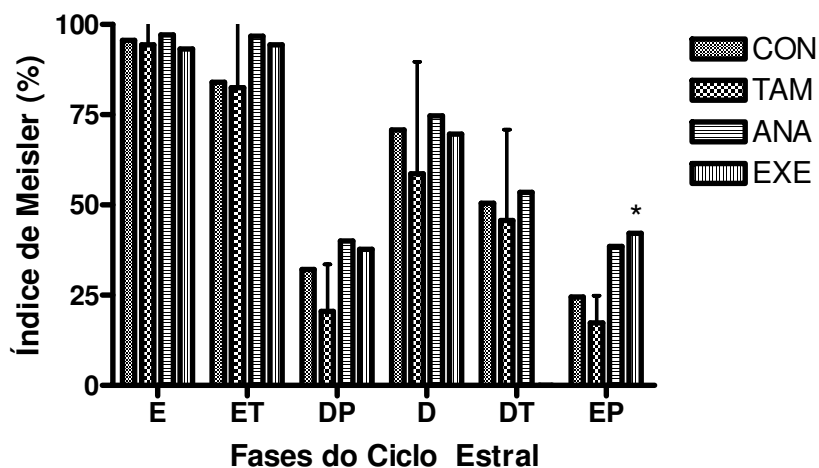


FIGURA 22 – Valores de Meisler para os grupos experimentais em cada fase do ciclo. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,05$).
 FONTE: dados de pesquisa.

O valor maturativo de Meisler, como exposto no gráfico anterior, apresenta-se acentuadamente diferente dos valores controle somente na fase EP do grupo EXE. Contudo, necessariamente cada fase deve possuir valores de maturação similares; pois, do contrário, a mudança na proporção celular levaria obrigatoriamente a alteração na classificação da fase. Mesmo assim, o EXE, aparentemente, conseguiu delimitar um grau maior de maturação, reforçando o mecanismo atribuído à inibição adeno-hipofisária.

Um bioensaio ideal deve apresentar robustez com baixas taxas de falsos negativos e positivos, além de ser capaz de caracterizar a substância de interesse (ASHBY et al, 2002). No presente trabalho o objetivo seria a identificação de um padrão de atividade inerente a cada substância testada. Assim, revelando perfis específicos atribuídos a competição pelo receptor de estrógeno (tamoxifeno); diminuição dos níveis séricos de estrógeno por competição com a enzima aromatase (anastrozol) e por inativação da mesma (exemestano). Até a presente análise, conseguiu-se delimitar a diferença entre o antagonista e os inibidores, mas não entre o perfil dos grupos ANA e EXE. Em seguida, é mostrada a correlação por cálculo de área entre o índice de Meisler e a duração em cada fase (Figura 23):

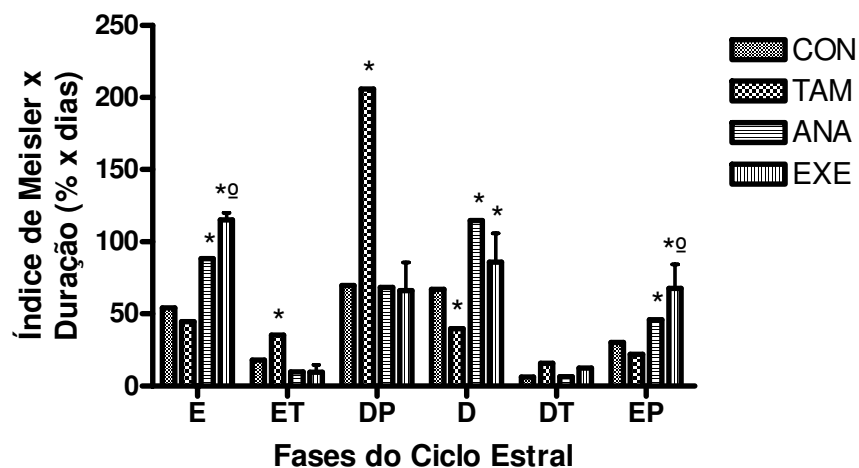


FIGURA 23 – Correlação por cálculo de área entre os valores de Meisler (%) e a duração das fases do ciclo (dias) para os grupos experimentais. * Estatisticamente significativo em relação ao grupo controle, ° estatisticamente significativo em relação ao grupo ANA ($p < 0,05$).

FONTE: dados de pesquisa.

Este gráfico sucinta algumas considerações:

- a) O estro apresenta-se com maior tempo e intensidade maturativa sob a ação dos inibidores e, dentre eles, o exemestano se mostrou de ação mais intensa;
- b) O estro tardio foi a primeira fase onde a capacidade proliferativa do tamoxifeno sobressaiu-se; nesta fase ocorre a transição da descamação intensa apresentada no estro para a proliferação da camada de células nucleadas típicas da fase de diestro precoce. O tamoxifeno aceleraria a presença de células nucleadas acarretando tanto a precocidade do estro tardio quanto o alargamento da fase seguinte;

- c) No diestro precoce encontra-se intensa proliferação com baixa maturação sob ação do tamoxifeno o que já foi apontado por Kim (2002); enquanto que os demais grupos não apresentaram alterações maturativas ou temporais em relação a esta fase do ciclo especificamente;
- d) O diestro é caracterizado por uma fase de escassez de elementos celulares, mas com predomínio relativo de células superficiais provenientes de uma descamação tardia das camadas mais internas da cavidade vaginal (LAMB, 1978); logo também seria uma fase de baixa atividade celular. O tamoxifeno diminuiu a duração deste padrão citológico em relação ao controle, provavelmente devido ao efeito proliferativo da fase anterior. Os inibidores alargaram o seu tempo de duração exercendo um efeito proliferativo significativo;
- e) O diestro tardio não revelou resposta significativa aos fármacos em nenhum dos grupos;
- f) Os inibidores aumentaram o tempo e a intensidade maturativa no estro precoce onde a ação do exemestano mostrou-se mais intensa neste sentido.

A correlação entre o IM e a duração das fases através do cálculo de “área sob a curva” revelou-se mais eficaz do que as duas grandezas de forma isoladas; pois acentuou as discrepâncias entre os três grupos, sugerindo uma maior atividade do exemestano nas condições experimentais propostas.

Alguns estudos em humanos mostram maior efetividade do exemestano, em termos de taxa de sobrevivência, quando comparado ao tamoxifeno em cerca de

30%. O mesmo protocolo aplicado ao anastrozol vs. tamoxifeno, mostrou 20% de sobrevida (RAVDIN, 2004). Um estudo de Milla-Santos e colaboradores (2000) avaliou 238 pacientes com tumores estrógenos positivos onde foi administrado tamoxifeno (40 mg/dia) e anastrozol (1 mg/dia) por três anos, a taxa de resposta não apresentou diferença estatística (respectivamente 23 e 34%). Outro estudo de fase II conduzido pela Organização Européia de Pesquisa e Tratamento de Câncer (European Organization for Research and Treatment of Câncer – EORTC), submeteu 112 pacientes com tumores estrógenos positivos divididos em dois grupos a 20 mg de tamoxifeno /dia e 25 mg de exemestano; o exemestano apresentou uma taxa de resposta de 44% contra 18% do tamoxifeno (LAKE, HUDIS, 2002).

Aparentemente o grupo EXE apresentaria uma capacidade maior de estimular a maturação o que poderia se dever a uma inibição mais intensa da aromatase; isto geraria uma queda brusca nos níveis estrogênicos inicialmente que seriam revertidos pelo aumento na secreção de LH e FSH. No entanto, este processo também estaria presente no grupo ANA, não ficando claro se os valores maiores de maturação do exemestano também poderiam ser atribuídos a uma menor inibição da aromatase nesta elevação estrogênica secundária. Apesar destas considerações não apresentarem subsídios para afirmação a de que houve diferença no padrão citológico do ciclo estral entre os grupos EXE e ANA; mas apenas que houve diferença de maturação em um momento do ciclo (E e EP). Faz-se necessário um tratamento biomatemático que correlacione o padrão citológico de forma integrada e permita a comparação não somente entre as fases; mas com o ciclo em sua totalidade.

De acordo com Mazucheli e Achcar (2002), *splines* são polinômios lineares por partes que satisfazem as condições de continuidade entre os fragmentos. Eles podem ser avaliados usando poucas operações aritméticas, requerendo pouco armazenamento de seus coeficientes e utilizando somente alguns pontos específicos, conhecidos como pontos de controle. Caracteriza-se como uma regressão não-linear de dados. Existem diferentes tipos de *spline*. A *spline* cúbica, em geral, é a mais empregada. Ela é uma função polinomial, podendo ser vista como um polinômio generalizado que tem certos pontos de derivada descontínua. Apresentam uma definição formal: seja $X=(x_0, x_1, \dots, x_k)$ ser um vetor de reais tal que $x_i \leq x_{i+1}$ (MINGUIN, 1999)

Alguns trabalhos se utilizaram deste artifício matemático quando os dados obtidos descreviam um comportamento cíclico, não linear e o processo de quantificação não permitia grande número de pontos, ou seja, peculiaridades inerentes a sistemas biológicos. Características encontradas, por exemplo, na caracterização da probabilidade de recidivas de câncer mamário após tratamento em várias condições versus tempo (BERHANE, WEISSFELD, 2003), na delimitação das variações séricas de cortisol como marcador circadiano (ALBERT, HUNSBERGER, 2005; WANG, KE, BROWN, 2003), na secreção pulsátil de hormônio adrenocorticotrófico no decorrer do dia (YANG, LIU, WANG, 2006), duração do ciclo menstrual na terceira década de vida e o início do climatério (NAN et al, 2005) e até mesmo em modelos farmacocinéticos de liberação prolongada (LI et al, 2002).

A Figura 24 mostra a regressão não linear por spline cúbica dos dados apresentados no gráfico anterior:

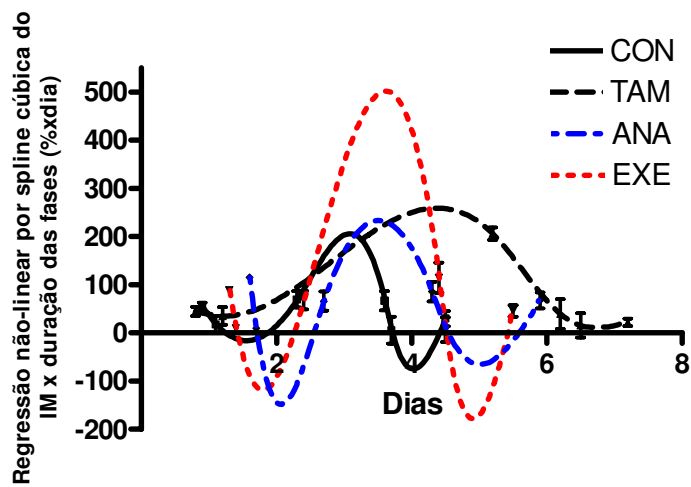


FIGURA 24 – Regressão não-linear por *spline* cúbica da correlação por cálculo de área entre os valores de Meisler (%) e a duração das fases do ciclo (dias) para os grupos experimentais.

FONTE: dados de pesquisa.

A função $f(x)$ para cada conjunto de dados acima (derivação de 172 pontos com intervalos de 58,9 minutos) mostrou o exemestano com picos máximo e mínimo de maior amplitude. O cálculo da área para as três funções mostrou-se significativamente diferente para os três grupos em relação ao controle e pareados entre si (Tabela 14).

TABELA 14 – Cálculo da área sob a curva das funções descritas na Figura 24. Natal, RN.

	COM	TAM	EXE	ANA
Área sob a curva	166,6 ± 14,6	643,1 ± 17,2	259,3 ± 13,5	231,4 ± 15,5

FONTE: dados de pesquisa

* Valores em média e desvio padrão.

Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e entre os grupos teste ($p < 0,05$).

Legenda: CON = controle, TAM = tamoxifeno, EXE = exemestano e ANA = anastrozol.

O tratamento matemático proposto sugere uma diferença no perfil de maturação celular e duração das fases do ciclo entre os fármacos avaliados.

Logo, o modelo experimental desenvolvido aparentemente poderia ser utilizado na caracterização de fármacos que o mecanismo de ação implique em repercussão na fisiologia do ciclo estral.

6. CONCLUSÕES

- Os animais utilizados e as condições experimentais se mostraram compatíveis com o observado na literatura;
- A técnica de coloração adaptada de Papanicolaou permitiu a caracterização qualitativa e quantitativa do ciclo estral murino;
- A técnica de coloração monocromática em base líquida desenvolvida mostrou-se eficaz na caracterização qualitativa e quantitativa do ciclo estral murino;
- A concentração dos fármacos usadas apresentou-se livre de toxicidade significativa e não ocasionou a ruptura do ciclo permitindo sua caracterização;
- Os grupos submetidos a administração dos fármacos nas condições estabelecidas mostrou comportamento citológico caracterizável pela técnica monocromática desenvolvida;
- Os grupos administrados mostraram incremento na duração do ciclo estral, sobretudo o grupo TAM;
- A correlação entre o IM e a duração das fases através do cálculo de “área sob a curva” revelou um perfil distinto entre o tamoxifeno e os inibidores da aromatase; dentre estes, o exemestano sugeriu uma maior eficácia na inibição da enzima;
- O cálculo de área da função obtida por regressão não-linear por spline cúbica para cada fármaco hormonioterápico, revelou perfis distintos. Logo, o modelo experimental desenvolvido aparentemente poderia contribuir para caracterização de compostos desta classe farmacológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, Paul S.; HUNSBERGER, Sally. On Analyzing Circadian Rhythms Data Using Nonlinear Mixed Models with Harmonic Terms. **Biometrics** v. 61, p. 1115-1122, dez. 2005.

ALBERTAZZI, P.; PURDIE D.W. Selective estrogen receptor modulators (SERM's) in postmenopausal women's health. **Reproductive Medicine Review** v. 8, n. 3, p. 215-228, 2000.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts and figures 2005. Atlanta: **American cancer Society**; 2005

ANDRADE, P.M.; BARACAT, E.C. Aspecto histomorfométrico do endométrio de ratas adultas castradas após o uso de estrogênio, progestogênio e tamoxifeno. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 21, p. 360, 1999.

ARAUJO, S. D. T. **Mortalidade, por câncer de mama, de mulheres com idade igual e superior a 50 anos – Estado de São Paulo – 1979 a 1997.** São Paulo; 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da USP].

ASHBY, J. et al. Concept Evaluation: An Assay for Receptor-Mediated and Biochemical Antiestrogens Using Pubertal Rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 35, p. 393–397, 2002.

AZRIA, D et al. Hormonothérapie adjuvante concomitante des cancer du sein: état de l'art. **Cancer Radiothérapie** v. 8, p. 188-196, 2004.

BARRACLOUGH, Charles A. Production of anovulatory, sterile rats by single injection of testosterone propionate. **Fonte Desconhecida.** v. 68, p. 62-67, jan. 1961.

BARRON-GONZALES, A.; ARIAS-MARTINES, J.; CASTRO-ROMERO, I. Antiestrogens: mechanism of action and clinical applications. **Salud Publica Mex.** v. 43, p. 577-584, 2001.

BERHANE, Kiros; WEISSFELD, Lisa A. Inference in Spline-Models for multiple time-to-event data with applications to a breast cancer preventions trial. **Biometrics** v. 59, p. 859-868, dez. 2003.

BERNSTEIN, S.J.; SANCHEZ-RAMOS, L.; NDUBISI, B. Liquid – based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. **Am. J. Obstet. Gynecol.** v. 185, p. 308-317, 2001.

BIGLER, L.R. et al. Evaluation of tamoxifen in persistent or recurrent nonsquamous cell carcinoma for the cervix: a Gynecologic Oncology Group study. **Int. J. Gynecol. Cancer.** v. 14, p. 871-874, 2004

BISHOP, J.W. et al. Multicenter evaluation of AutoCyte Prep thin layers with matched conventional smears. **Acta Cytol.** v. 42, p. 189-193, 1998.

BOLICK, D.R.; HELLMAN, D.J. Laboratory implementation and efficacy assessment of the ThinPrep cervical cancer screening system. **Acta Cytol.** v. 42, p. 209-212, 1998.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil: 2005.* Disponível em <<http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa/2005>>. Acessado 10 abr 2005.

BRUGUERAS, Manuel Cué. El exemestano, un inhibidor de aromatasa, nueva opción en el tratamiento del cáncer de mama. **Rev. Cubana Farm.** v. 38, n. 2, 2004.

BUSDAR, A.U. Hormonal therapy in early and advanced breast cancer. **The Breast Journal** v. 10, s. 1, p. s19-s21, 2004.

BUZDAR, Aman U. Pharmacology and Pharmacokinetics of the Newer Generation Aromatase Inhibitors. **Clinical Cancer Research**. v. 9, p. 468s– 472s, Jan. 2003.

CARTHEW, P. et al. Tamoxifen induces endometrial and vaginal cancer in rats in the absence of endometrial hyperplasia. **Carcinogenesis** v. 21, p. 793-797, 2000.

CARVALHO, G. **Citologia do trato genital feminino**. 4° ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 254 p.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S.M. **A Célula 2001**. São Paulo: Editora Manole, 2001, p. 19-27.

COLORADO STATE UNIVERSITY. Classification of vaginal epithelial cells. Disponível em:
<<http://arbi.cvmbbs.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/vc/cells.html>>.
Acesso em 02 fev. 2005.

CUZICK, J; BAUM, M. Tamoxifen and contralateral breast cancer. **Lancet** p. 270-282, 1985.

DAVDSON, H.; EGGLETON, M.G. **Principles of human physiology**. 30° ed. Londres: J. & A. Churchil LTD, 1962. p. 1467-1477.

DE GREGORIO, M.W.; WILBUR, B.J.; CORONADO, E.; OSBORNE, C.K. Serum tamoxifen concentrations in the athymic nude mouse after three methods of administration. **Câncer Chemother. Pharmacol.** v. 20, p. 316-318, 1987.

DOMONT, J. et al. Hormonothérapie néoadjuvante dans le cancer du sein: revue de littérature. **Bull. Cancer** v. 91, n. 1, p. 55-62, 2004.

DOWSETT, J.M.; JOHNSTON, M.; JACOBS, S.R. In vivo measurement aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer. **Clin. Cancer Res.** v.1, p. 1511-1515, 1995.

DUKES, M. et al. The Preclinical Pharmacology of "Arimidex TM (Anastrozole; ZD1033) -- a Potent, Selective Aromatase Inhibitor. **SteroidBiochem. Molec. Biol.** v. 58, n. 4, p. 439-445, 1996.

DUKES, M. The relevance of preclinical models to treatment of postmenopausal breast cancer. **Oncology** v. 54, s. 2, p. 6-10, 1997.

EARLY BREAST CANCER TRIALIST'S COLLABORATIVE GROUP. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. **Lancet**, Londres, v. 339, p.1-15. 1992.

ENMARK, E. et al. Human estrogen receptor gene structure, chromosomal localization and expression pattern. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** v. 82, p. 4258-4265, 2002.

FACINA, G. et al. Efeitos de diferentes doses de tamoxifeno sobre a proliferação celular do epitélio mamário. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 25, p. 185-191, 2003.

FEITOSA, F.E.L.; JUACABA, S.F.; MEDEIROS, F.C. Alterações Endometriais em Pacientes com Câncer de Mama Tratadas com Tamoxifeno. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 24, p. 233-239, 2002.

FERNANDEZ, M. Animales como modelo experimental. Portal Veterinária. Disponível em:<
<http://www.portalveterinaria.com/sections.php?op=viewarticle&artide48>>.

Acesso em: 12 de ago de 2005.

FOYE, W.O.; LENKE, T.L.; WILLIAMS, D.A. **Sex steroids. In: Foye et al. Principles of medicinal chemistry.** 4° ed. New York. Wilians & Wilians, 1995. p.470-478.

GEHLEN, Marcelo Luiz et al. Spectrophotometric evaluation of Evans blue in inflammatory cornea reaction: experimental study in rabbits. **Arq. Bras. Oftalmol.** v. 67, p. 219-225, 2004.

GREAVES, P. et al. Two-years carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. **Cancer Res.** v. 53, p. 3919-3924, 1993.

HIRAI, M. et al. Androgen receptor mRNA in the rat ovary and uterus. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.** v. 49, p. 1-7, 1994.

HIRSIMAKI, Pirkko; AALTONEN, Annukka; MANTYLA, Eero. Toxicity of antiestrogens. **The Journal Breast** v. 8, n. 2, p. 92-96, 2002.

INCA/MS – PROCEDURES. Conduas do INCA: Câncer de mama. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 47, p. 9-19, 2001.

JEMAL, Ahmedin et al. Cancer Statistics, 2004. **CA Cancer J. Clin,** v. 54, p. 8 – 29, jan. 2004.

JORDAN, V.C. An overview considerations for testings of tamoxifeno as a preventive for breast cancer. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 768, p. 141-147, 1995.

KENNEL, Philippe et al. Tamoxifen: 28-day oral toxicity study in the rat based on the Enhanced OECD Test Guideline 407 to detect endocrine effects. **Archives of Toxicology** v. 10, n. 5, p. 968-972, jun. 2003.

KIM, Hyung Sik et al. Evaluation of the 20-day pubertal assay in sprague-dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone and flutamide. **Toxicological Science**. v. 67, p. 52-62, 2002.

KRISHNAN, L. et al. Breast conservation therapy with tumor bed irradiation alone in a selected group of patients with stage I breast cancer. **The Breast Journal** v. 7, n. 2, p. 91-96, 2002.

KUDCHADKAR, R.; O'REGAN, R. M. Aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal patients with early stage breast cancer. **CA Cancer J. Clin.** v. 55, p. 146-163, 2005.

LAKE, D.E.; HUDIS, C. Aromatase Inhibitors in breast cancer: an update. **Cancer Control 2002** v. 6, n. 9, p. 490-498, 2002.

LAMB, James C. et al. Transitional Changes in the Surface Epithelium of the Cycling Mouse Vagina, Cervix and Uterus: Scanning Electron Microscopic Studies. **Biology of reproduction** v. 19, p. 701-711, 1978.

LENCIONI, L.J. **Citologia endócrina**. Buenos Aires: Médica Pan Americana, 1987. p. 304.

LEVINE, Mark et al. Guide de pratique clinique pour la prise en charge et le traitement du cancer du sein. **Canadian Medical Association Journal** v.172, n. 11, mai 2005.

LIN, Lang et al. Estimation and Inference for a Spline-Enhanced Population Pharmacokinetic Model. **Biometrics** v. 58, p. 601-611, 2002.

LONG, J.A.; EVANS, H. **The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena**. California: Memoirs of the Univ. California, 1922. p.1-148.

LUSTOSA, A. B. et al. Citologia hormonal do trato urinário baixo e da vagina de mulheres na pós-menopausa, antes e durante estrogenerioterapia oral e transdérmica. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 24, p. 573-577, 2002.

MANDL, Anita. The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. **Fonte desconhecida**. p. 576-584, 1951.

MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the oestrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.** v. 62, sup. 4, p. 609-614, 2002.

MATFIELD, M. The ethics of animal research. **Exp. Animal** v. 45, n. 3, p. 209-215, 1996.

McCALLUM, William G. **Cálculo de várias variáveis**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 1997, 294 p.

MERCK & CO. INC. **Merck index: an encyclopedia of chemical, drugs and biologicals**. 11^o Ed. New York (USA): Rahway, 1989.

MILLA-SANTOS, A. et al. Phase III trial of anastrozole (AN) vs tamoxifen (TAM) in postmenopausal (PM) patients (PTS) with hormone-dependent advanced breast cancer (ABC). **Breast Cancer Res. Treat.** v. 64, p. 54-58, 2000

MINGUIN, R. **Modelagem de objetos por splines**. Campinas; 1999; p. 127 [Dissertação (Mestrado) – Instituto Militar de Engenharia].

MINISTERIO DA SAUDE / INCA. Controle do Câncer de mama – Documento de Consenso. **Rev. Brás. Cancerologia** v. 50, n. 2, p. 77-90, 2004.

NAN, Bin et al. A varying-coefficient cox model for the effect of age at a marker evento on age at menopause. **Biometrics** v. 61, p. 576-583, jun. 2005.

NAYFIELD, S.G.; GORIN, M.B. Tamoxifen-associated eye diseased. A review. **Journal of Clinical Oncology** v. 14, p. 1018-1026, 1996.

NELSON, James F. et al. A Longitudinal Study of Estrous Cyclicity in Aging C57BL/6J Mice: I. Cycle Frequency, Length and Vaginal Cytology. **Biology of reproduction** v. 27, p. 327-339, 1982.

O'BRIEN, Kathryn. Cancer Statistics for Hispanics, 2003. **CA Cancer J. Clin.** v. 53, p. 208 – 226, jul 2003.

PAIXÃO, Rita Leal. **Experimentação animal: razões e emoções para uma ética.** São Paulo; 2001; p. 32 [Doutorado - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública].

PAPANICOLAOU, George N. The sexual cycle in the human female as revealed by vaginal smears. **The American Journal of Anatomy**, Nova York, v. 52, n. 3, p. 519-635, mai 1933.

PELLETIER, G. Localization of androgen and estrogen receptors íon rat and primate tissues. **Histol. Histopathol.** v. 15, p. 1261-1270, 2000.

PEREIRA, Sonia M.M. et al. Celularidade citológica em preparados de base líquida. **Rev. Inst. Ad. Lutz.** v. 62, n. 1, p. 35-9, 2003.

PETERS-ENGL, Christian et al. Association between endometrial cancer and tamoxifen treatment of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 54, p. 255-260, 2000.

RAVDIN, P.M. Aromatase inhibitors in adjuvant therapy: promise and uncertainty. **Community Oncology** v. 1, n. 4, p. 219-224, 2004.

RICCI, Paolo A. et al. Citología de base líquida: revisión de la historia y los estudios al respecto. **Rev. Chil. Obstet Ginecol**. Santiago, v. 69, n. 3, p. 256-262, 2004.

SAAD, E. D. et al. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. **Rev. Bras. Cancerol**. 2002; v. 48, p. 555-567, 2002.

SANTEN, R.J.; SAMOJLIK, E; WELLS, S.A. Resistance of the ovary to blockade of aromatization with aminoglutethimide. **J. Clin. Endocrinol. Metab**. v. 51, p. 473-477, 1980.

SANTOS, A.V.; FERRAZZOLI, M.O. **Ciclo estral nos Animais**. Rede Veterinária. Disponível em:
<<http://www.redevet.com.br/artigos/estral1.htm>>. Acesso em 10 de set 2005.

SARTORI, M.G.F. et al. Menopausal genuine stress urinary incontinence treated with conjugated estrogens plus progestogens. **Int. J. Gynaecol. Obstet**. v. 49, p. 165-169, 1995.

SHIDA, J.Y. et al. Estudo morfológico e morfométrico da mama de ratas em estro permanente, tratadas com danazol. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet**. v. 23, p. 41-45, 2001.

SILVA, B.B. et al. Efeito do tamoxifeno e dos estrogênios conjugados no epitélio mamário de ratas em estro permanente. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 22, p. 33-36, 2000.

SIMPSON, E.R. et al. Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine. Rev.** v.15, p. 342–355, 1994.

SINHA, S. et al. Effect of CGS 20267 on ovarian aromatase and gonadotropin levels in the rat. **Breast Cancer Research and Treatment.** v. 48, p. 45–51, 1998.

SMITH, Ian E.; DOWSETT, Mitch. Aromatase Inhibitors in breast cancer. **N. Engl. J. Med.** v. 348, p. 2431-2442, 2003.

SMITH, Robert et al. American Cancer Society Guidelines for Breast Cancer Screening: Update 2003. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v.53, p. 141 – 69, mai. 2003.

STEWART, H.J. et al. Randomised comparison of 5 years of adjuvant tamoxifen with continuous therapy for operable breast cancer: the Scottish Cancer Trials Breast Group. **Br. J. Cancer** v. 74, p. 297-299, 1996.

STOCKARD, C.R.; PAPANICOLAOU, G.N. The existence of a typical oestrous cycle in the guinea pig with a study of its histological and physiological changes. **Am. J. Anat.**, v. 22, p. 225-280, 1917.

TAKAHASHI, M.; NAITO, M. Application of the cytorich monolayer preparation system for cervical cytology: a prelude to automated primary screening. **Acta Cytol.** v. 41, p.1785-1789, 1997.

VELASCO, J. Citología Líquida. **VPH Hoje.** v. 1, p. 8-9, 2001.

WANG, Yuedong; KE, Chunlei; BROWN, Morton B. Shape-invariant modeling of circadian rhythms with random effects and smoothing spline ANOVA decompositions. **Biometrics** v. 59, p. 804-812, dez. 2003.

WHITTEN, W. K. Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the female. **Journal Endocrinology** v. 17, p. 307-313, 1958.

WICKERHAM, Lawrence. Tamoxifen – an update on current data and where it can now be used. **Breast Cancer Research and Treatment**. v. 75, p. S7-S12, 2002.

WILLIAMS, G.M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology** v. 166, p. 3-10, 2001.

YANG, Yu-Chieh; LIU, Anna; WANG, Yuedong. Detecting Pulsatile Hormone Secretions Using Nonlinear Mixed Effects Partial Spline Models. **Biometrics** v. 62, p. 230-238, mar. 2006.

ZOGNO, Maria Amélia. **Aspecto reprodutivos da fêmea de mocó (*Kerodon rupestris*): Análise bioquímica dos líquidos fetais e caracterização colpocitológica do ciclo estral**. 2000. [Tese de doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica da Universidade de São paulo].

ZUBER, R.; ANZENBACHEROVÁ, E.; ANZEBACHER, P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. **J. Cell Mol. Med.** v. 6, n. 2, p. 189-198, 2002.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1

Técnica de coloração de papanicolaou adaptada pela Disciplina de citologia Clínica – DACT/UFRN

Cuba 01	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 02	Água destilada	10 mergulhos
Cuba 03	Hematoxilina de Harris	06 minutos
Cuba 04	Água destilada	10 mergulhos
Cuba 05	Água corrente	10 mergulhos
Cuba 06	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 07	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 08	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 09	Orange G	02 minutos
Cuba 10	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 11	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 12	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 13	EA 65	05 minutos
Cuba 14	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 15	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 16	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 17	Álcool etílico	10 mergulhos
Cuba 18	Xilol	10 mergulhos

8.2 Anexo 2

Veículo utilizado na administração dos fármacos hormonioterápicos

Sorbitol 70%.....	20 mL
Carboximetilcelulose.....	0,5 g
Água destilada.....	qsp 100mL