

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ – UESC

HANNAH BANDEIRA THAME DANIEL

**EFEITO DA TERAPIA COM FIROCOXIBE EM CASOS DE NEOPLASIA
MAMÁRIA CANINA - Avaliação sobre a Expressão da COX-2 e do VEGF**

ILHÉUS- BA

2014

HANNAH BANDEIRA THAME DANIEL

**EFEITO DA TERAPIA COM FIROCOXIBE EM CASOS DE NEOPLASIA
MAMÁRIA CANINA - Avaliação sobre a Expressão da COX-2 e do VEGF**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de
Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção
do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Ciência Animal
Orientador: Prof^a Dr^a Roueda Abou Said

ILHÉUS- BA

2014

HANNAH BANDEIRA THAME DANIEL

**EFEITO DA TERAPIA COM FIROCOXIBE EM CASOS DE NEOPLASIA
MAMÁRIA CANINA - Avaliação sobre a Expressão da COX-2 e do VEGF**

Ilhéus – BA, 29/08/2014

Roueda Abou Said – *DSc*
UESC/DCAA
(Orientador)

Ana Flávia Ribeiro Machado Michel – *DSc*
UESC/DCAA

Gleidice Eunice Lavalle – *DSc*
UFMG

ILHÉUS- BA

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, por terem me incentivado a seguir a carreira acadêmica e a não desistir em meio a tantos percalços.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa pesquisa, muitas pessoas contribuíram para que resultados satisfatórios pudessem ser obtidos e por isso gostaria de agradecer por todo apoio fornecido.

À Universidade Estadual de Santa Cruz e à CAPES pelo fornecimento da bolsa e toda infraestrutura necessária para a realização desse estudo.

À minha querida orientadora, Professora Dra. Roueda Abou Said, por ter aceito a difícil tarefa de me orientar durante esse período e por ter contribuído da melhor maneira possível com meu crescimento profissional. Obrigada por ter estado ao meu lado em todos os momentos e por ter compartilhado comigo parte do seu extenso conhecimento.

Às Professoras Dra. Ana Flávia Ribeiro, minha co-orientadora e Dra. Fabiana Silva Lessa, gostaria de agradecer pela disposição em nos ajudar e contribuir profundamente com os resultados obtidos. A experiência de conhecer mais detalhadamente a patologia das neoplasias mamárias foi de fundamental importância para a interpretação e apresentação deste trabalho.

À querida Professora Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, pelo privilégio de ter me recebido em seu laboratório, permitindo executar técnicas essenciais para o desenvolvimento do nosso trabalho. Agradeço pelos ensinamentos partilhados, pelas oportunidades de aprender sempre mais e pelo carinho com o qual me recebeu em sua Instituição de ensino.

Às Professoras Dra. Elisângela Silva Barboza e Dra. Rosana Clark por terem auxiliado na execução de uma etapa essencial para a nossa pesquisa. Obrigada pela disposição e empenho em contribuir com nosso trabalho.

À professora Dra. Kátia Moema Sampaio, que além de contribuir com excelente desempenho profissional na prática da Ultrassonografia, sempre me encorajou com sua imensa sabedoria e otimismo. Grata pelas palavras de apoio e carinho proferidas a mim durante esse tempo de convívio.

À toda equipe da Clínica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UESC, pela ajuda fornecida durante os atendimentos clínicos e pela palavra amiga nos momentos mais tensos, em especial à Givaldo e Silvina. Vocês foram grandes companheiros nessa empreitada.

À equipe do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo – USP, pela disposição em me ensinar técnicas imprescindíveis para execução desse trabalho, sobretudo à querida Marguite Soares e ao Dr. Lucas Chaible, pelas conversas descontraídas e ao mesmo tempo tão cheias de saber.

Às minhas queridas bolsistas de Iniciação Científica, por terem dividido comigo um pouco desse desafio. Cada uma de vocês contribuiu à sua maneira e sou grata a todas por tanto carinho e respeito.

Aos proprietários e as cadelas que participaram desta pesquisa, pois sem elas não teríamos conseguido respostas que buscamos constantemente. Foi visando o bem-estar dos nossos queridos animais que nos empenhamos tanto para executar essa tarefa. Sem eles, nada disso faria sentido.

EFEITO DA TERAPIA COM FIROCOXIBE EM CASOS DE NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA - Avaliação sobre a Expressão da COX-2 e do VEGF

RESUMO

Estudos apontam para associação entre a superexpressão da enzima ciclooxigenase do tipo 2 (COX-2) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) com neoplasias mamárias caninas, e indicam tratamento com inibidores da COX-2 para estes casos. Objetivou-se avaliar a expressão da COX-2 e do VEGF em neoplasias mamárias de cadelas tratadas e não tratadas com o anti-inflamatório não esteroide (AINEs) firocoxibe. A terapia foi administrada por via oral, na dose 5 mg/kg de peso corporal, a cada 24 horas, durante 30 dias, em período anterior ao encaminhamento cirúrgico. 32 das 33 amostras de neoplasia mamária que compuseram este estudo foram classificadas como malignas. Observou-se a expressão da COX-2 em 78,9% das amostras do grupo 1, e em 46,6% das amostras do grupo 2. A expressão do VEGF foi detectada em 53% das amostras do grupo 1, e em 74% das amostras do grupo 2. Houve correlação positiva entre estes dois marcadores, em ambos os grupos. Não foi verificada associação significativa entre a expressão da COX-2 e do VEGF e as variáveis clinicopatológicas, como tipo histopatológico e tamanho do tumor. O uso de inibidores da COX-2 reduziu o diâmetro tumoral, em 28,5% das neoplasias analisadas. No entanto, não houve redução proporcional desta enzima nos tecidos tumorais, havendo expressão significativamente mais elevada da COX-2 ($p= 0,019$) no grupo de animais tratados com firocoxibe, em comparação aos não tratados. Conclui-se que o tratamento com firocoxibe acarretou na melhora clínica de cadelas com neoplasia mamária, entretanto, não reduziu a expressão da enzima COX-2 e do VEGF nas amostras neoplásicas.

Palavras-chave: COX-2. VEGF. Neoplasia. Prognóstico. Firocoxibe.

EFFECTS OF FIROCOXIB THERAPY ON CANINE MAMMARY TUMORS – Evaluation of COX-2 and VEGF Expression

ABSTRACT

Studies point to an association between overexpression of the enzyme cyclooxygenase type 2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in canine mammary tumors, and indicate treatment with COX-2 in these cases. Aimed to evaluate the expression of COX-2 and VEGF in breast tumors of bitches treated and untreated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) firocoxibe. Therapy was administered orally at a dose 5 mg / kg body weight, every 24 hours for 30 days prior to the surgical forwarding period. 32 of 33 breast cancer samples that comprised this study were classified as malignant. We observed the expression of COX-2 in 78.9% of the samples of group 1 and 46.6% in group 2 samples. VEGF expression was detected in 53% of the samples of group 1 and 74 % of the group 2 samples. There was positive correlation between these two markers in both groups. There was no significant association between the expression of COX-2 and VEGF and clinicopathological variables as histopathological type and tumor size. The use of COX-2 reduced the tumor size in 28.58% of tumors analyzed. However, there was no proportional reduction of this enzyme in tumor tissues, with significantly higher expression of COX-2 ($p = 0.019$) in the group of animals treated with firocoxibe compared to untreated. We conclude that treatment with firocoxibe resulted in clinical improvement in dogs with mammary tumors, however, did not reduce the expression of COX-2 and VEGF in neoplastic samples.

Keywords: COX-2. VEGF. Neoplasms. Prognosis. Firocoxibe.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cadeia mamária e respectiva drenagem linfática | 16 |
| Figura 2. Classificação Histológica das Neoplasias Mamárias Caninas..... | 28 |
| Figura 3. Variações nas opções de ressecção cirúrgica | 30 |
| Figura 4. Mensuração de neoplasia mamária | 35 |
| Figura 5. Localização das neoplasias na cadeia mamária das cadelas do tratadas com firocoxibe (grupo 1) e não tratadas com firocoxibe (grupo2) | 42 |
| Figura 6. Amostras histopatológicas de fragmentos neoplásicos retirados de cadelas com neoplasias mamárias | 44 |
| Figura 7. Carcinoma tubular com áreas micropapilares. Imunorreatividade para COX-2 | 46 |
| Figura 8. Carcinoma papilar. Imunorreatividade para COX-2 | 47 |
| Figura 9. Carcinoma papilar. Imunorreatividade para COX-2 | 47 |
| Figura 10. Média da expressão da COX-2 em neoplasias mamárias caninas comparando-se os animais tratados e não tratados com o firocoxibe | 48 |
| Figura 11. Relação entre a reatividade da COX-2 e a redução do diâmetro das neoplasias em pacientes do grupo 1 | 48 |
| Figura 12. Carcinosarcoma. Imunorreatividade para VEGF | 49 |
| Figura 13. Carcinoma papilar invasor. Imunorreatividade para VEGF..... | 49 |
| Figura 14. Média da expressão do VEGF em neoplasias mamárias caninas comparando-se os animais tratados e não tratados com o firocoxibe | 50 |
| Figura 15. Análise de correlação entre a expressão da COX-2 e VEGF em neoplasias mamárias de cadelas tratadas e não tratadas com o firocoxibe | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Relação dos anticorpos primários, clone, marca do anticorpo e diluição utilizada nos cortes de neoplasias mamárias de cadelas | 37 |
| Tabela 2. Mensuração do diâmetro tumoral (cm) durante o período de tratamento com o firocoxibe | 43 |
| Tabela 3. Avaliação da expressão da COX-2 e VEGF em tumores mamários caninos dos animais pertencentes ao grupo tratado com firocoxibe (Grupo 1) | 45 |
| Tabela 4. Avaliação da expressão da COX-2 e VEGF em tumores mamários caninos dos animais pertencentes ao grupo não tratado com firocoxibe (Grupo 2) | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- OH** – ovário-histerectomia
- GH** - hormônio de crescimento
- IGF** – fator de crescimento semelhante à insulina
- COX-1** – ciclooxigenase -1
- COX-2** – ciclooxigenase - 2
- DMV** – densidade de microvasos
- CD31** - aglomerado de diferenciação 31
- VEGF** - fator de crescimento vascular endotelial
- PCNA** – antígeno nuclear de proliferação celular
- AINEs** – antiinflamatórios não-esteroidais
- ALT** - alanina amino transferase
- AST** - aspartato amino transferase
- HE** – hematoxilina e eosina
- EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético
- BSA** – albumina sérica bovina
- DAB** – diaminobenzidine

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 13 |
| 2. OBJETIVOS | 15 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 3.1 Anatomia e morfologia da glândula mamária | 16 |
| 3.2 Epidemiologia e etiopatogenia das neoplasias mamárias | 18 |
| 3.2.1 Etiologia Hormonal | 20 |
| 3.3 Influência da inflamação sobre as neoplasias mamárias | 22 |
| 3.4 Avaliação clinico-patológica | 26 |
| 3.4.1 Avaliação Histopatológica | 27 |
| 3.4.2 Avaliação Imunohistoquímica | 29 |
| 3.5 Modalidades de terapia | 29 |
| 3.5.1 Quimioterapia | 30 |
| 3.6 Uso de inibidores da COX-2 no tratamento das neoplasias mamárias | 31 |
| 4. METODOLOGIA | 34 |
| 4.1. Aspectos Éticos | 34 |
| 4.2. Delineamento Experimental | 34 |
| 4.3. Processamento de material e análise por H&E | 37 |
| 4.4. Processamento e análise de Imunohistoquímica | 37 |
| 4.5. Análise Estatística | 39 |
| 5. RESULTADOS | 41 |
| 5.1 Dados epidemiológicos | 41 |
| 5.2 Análise descritiva das lesões | 43 |
| 5.3 Expressão da COX-2 em tumores mamários caninos | 44 |
| 5.4 Expressão do VEGF em tumores mamários caninos | 49 |
| 5.5 Correlação entre a expressão da COX-2 e do VEGF | 51 |
| 6. DISCUSSÃO | 52 |
| 7. CONCLUSÃO | 57 |
| REFERÊNCIAS | 59 |
| ANEXO I | 66 |

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias mamárias têm sido diagnosticadas como as neoplasias mais comuns em cadelas. Estima-se que 50% dessas neoplasias possuem caráter maligno (QUEIROGA, 2005) e acometem animais com faixa etária entre nove a doze anos (QUEIROGA et al., 2002).

Essas neoplasias constituem um desafio para clínicos, cirurgiões e patologistas veterinários devido à sua complexidade, no que se refere à patogenia e padrões histológicos (FERRI, 2003).

Diversos fatores podem levar ao surgimento de neoplasias mamárias. Dentre estes, tem sido descrita a importância dos fatores de crescimento e da inflamação na patogenia dessas neoplasias (SLEECKX et al., 2011).

Dentre os fatores de crescimento que atuam na patogenia da neoplasia mamária, destaca-se o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o qual estimula a angiogênese, contribuindo para o crescimento e progressão tumoral (RESTUCCI et al., 2002). Segundo Efthymia et al. (2002), o VEGF desempenha um papel chave na proliferação e migração de células endoteliais.

Um estudo realizado por Qiu et al. (2008), verificou-se que a expressão de VEGF é maior em células da neoplasia mamária canina quando comparada ao tecido mamário normal e foi demonstrado que expressão dessa enzima está associada a prognósticos ruins.

O papel da inflamação e sua influência sobre as neoplasias mamárias não está completamente elucidado. Contudo, estudos demonstram haver uma associação entre inflamação e neoplasias, em que mediadores inflamatórios contribuem para a progressão da doença (MURDOCH et al., 2008). Dentre estes, destacam-se a enzima ciclooxigenases do tipo 2 (COX-2) (JARK et al., 2011).

Estudos realizados em neoplasias mamárias caninas sugerem associação entre a expressão da COX-2 e angiogênese, desenvolvimento de metástases, pior prognóstico e menor período de sobrevida (QUEIROGA et al., 2005; MILLANTA et al., 2006; LAVALLE et al., 2009).

Guimarães et al. (2014), avaliaram a expressão da COX-2 em tecidos mamários neoplásicos malignos e constataram que todos os tecidos foram

positivos para a expressão dessa enzima, sugerindo a influência da COX-2 sobre a patogenia das neoplasias mamárias caninas.

Diante da associação entre a expressão da COX-2 e neoplasias malignas, recomenda-se o uso de antiinflamatórios (AINEs) inibidores dessa enzima como uma potencial ferramenta terapêutica (QUEIROGA et al., 2009).

Dessa forma, faz-se necessária a investigação da expressão da COX-2 em neoplasias mamárias, com classificações histopatológicas distintas, bem como uma avaliação sobre o efeito do uso de AINEs, COX-2 seletivos, sobre esta expressão (DE NARDI et al., 2011).

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Objetivou-se avaliar a expressão da COX-2 e do VEGF em neoplasias mamárias de cadelas tratadas e não tratadas com o anti-inflamatório não estereoidal (AINEs) firocoxibe.

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão da COX-2 e do VEGF, por método imunohistoquímico, em 33 tecidos neoplásicos de cadelas diagnosticados com diferentes tipos histopatológicos.
- Relacionar as expressões da COX-2 e VEGF com as características clínico-patológicas dos animais pertencentes ao estudo.
- Analisar a correlação entre esses marcadores e a associação dos mesmos com os fatores clínico-patológicos
- Avaliar os efeitos da administração oral do firocoxibe, durante 30 dias, sobre os aspectos clínico-patológicos das neoplasias mamárias caninas, e sobre a expressão COX-2 e VEGF nestes casos;
- Contribuir com dados a respeito da participação dos mediadores da inflamação e expressão do VEGF no comportamento biológico das neoplasias mamárias de cadelas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ANATOMIA E MORFOLOGIA DA GLÂNDULA MAMÁRIA

A cadela apresenta, em média, cinco pares de glândulas mamárias. O primeiro par de glândulas é denominado de torácica cranial, o segundo par é conhecido como torácica caudal, o terceiro, abdominal cranial, o quarto, abdominal caudal e o quinto par é denominado glândulas inguinais (figura 1) (GONÇALVES, 2008).

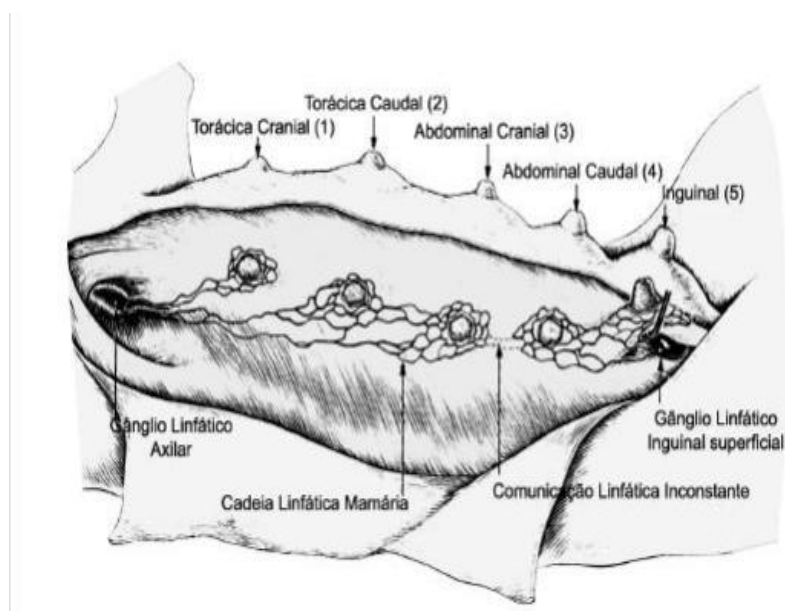


Figura 1. Cadeia mamária e respectiva drenagem linfática (Adaptado de Evans, 1993).

Fonte: Gonçalves, 2008.

Estruturalmente, as glândulas mamárias são formadas por um composto tubuloalveolar, formado pelo parênquima (alvéolos), estroma (tecido conectivo), ductos, vasos e nervos (SLEECKX et al., 2011).

O composto tubuloalveolar é dividido em lóbulos, separados por septos conjuntivos interlobulares, cujos ductos drenam para canais excretores mais calibrosos (ductos lactíferos). Estes se transformam em seios lactíferos, que são conduzidos para a superfície da teta, através da conduta papilar (FILGUEIRA, 2003).

Os alvéolos são compostos de um epitélio secretório simples cuboidal a colunar, dependendo da atividade secretora da glândula. Esse epitélio está cercado por células mioepiteliais, as quais estão cobertas pela membrana basal. As células mioepiteliais são consideradas contráteis, e sob a influência da ocitocina, auxiliam na liberação láctea (SLEECKX et al., 2011).

Segundo Sleenckx et al. (2011), os ductos menores são revestidos por um epitélio cuboidal simples, enquanto que os ductos maiores possuem um epitélio cuboidal a colunar bi-estratificado. Já os ductos papilares são revestidos por um epitélio escamoso queratinizado. Além do tecido epitelial, os fibroblastos e as células adiposas compõem e fazem a sustentação do tecido mamário (ZUCCARI et al., 2001).

As glândulas mamárias necessitam de suprimento sanguíneo e este é feito através de artérias e veias. Embora haja variação na vascularização, usualmente, as glândulas torácicas recebem sangue através da artéria epigástrica superficial cranial, bem como através de ramos provenientes das artérias torácica lateral e intercostal (SLEECKX et al., 2011).

A glândula abdominal cranial recebe aporte sanguíneo através da artéria epigástrica superficial cranial, enquanto que o sangue que é fornecido à glândula abdominal caudal provém da artéria epigástrica superficial caudal. Já a irrigação das glândulas inguinais provém das artérias labial e íliaca circunflexa profunda. Alguns vasos atravessam a linha média para a glândula contralateral (GONÇALVES, 2008).

A drenagem venosa das glândulas é bastante similar à irrigação arterial, exceto pelo fato de que pequenas veias podem cruzar a linha média entre as glândulas direita e esquerda, com mais frequência, e isso facilita o deslocamento de células neoplásicas malignas para glândulas mamárias adjacentes e contralaterais (SILVA, 2006).

O sangue venoso é drenado das glândulas torácicas através de ramos provenientes da veia torácica interna, veias epigástricas superficiais craniais veias intercostais. As glândulas abdominais e inguinais drenam para a veia epigástrica superficial caudal (SLEECKX et al., 2011).

Cada glândula mamária contém pequenos vasos linfáticos e vasos maiores, que em conjunto, drenam para os linfonodos. Vasos linfáticos de glândulas ipsilateral e contralateral podem sofrer anastomose, ou seja, pode

haver comunicações entre eles (SLEECKX et al., 2011). No entanto, o que ocorre mais comumente é a drenagem para o linfonodo mais próximo (FILGUEIRA, 2003).

A drenagem linfática das glândulas torácica cranial e torácica caudal é realizada pelo gânglio axilar. A drenagem das glândulas abdominal caudal e inguinal é realizada pelo gânglio linfático inguinal superficial (QUEIROGA, 2002). Já a drenagem das glândulas abdominais craniais é feita tanto pelo linfonodo axilar acessório quanto pelo linfonodo inguinal superficial (FILGUEIRA, 2003).

3.2 EPIDEMIOLOGIA E ETIOPATOGENIA DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Dentre as neoplasias que acometem as cadelas, as mamárias são aquelas de maior frequência, ocorrendo em 50 % de todos os casos neoplásicos (GUIMARÃES, 2013). Além de possuir alta incidência na espécie canina, outro aspecto que salienta a importância desta neoplasia é o fato de que aproximadamente 50% destas são malignas (SLEECKX et al., 2011).

Nas cadelas, o desenvolvimento das neoplasias mamárias ocorre de forma mais frequente nas mamas abdominais caudais e inguinais, provavelmente pelo fato destas apresentarem maior quantidade de parênquima, com maior atividade proliferativa (CARVALHO, 2006).

A etiologia das neoplasias mamárias caninas é bastante complexa, tendo sido atribuída a diversos fatores (QUEIROGA, 2005), como etários, raciais, genéticos, nutricionais e endócrinos (DORÉ et al., 2003; RIVERA et al., 2009; SLEECKX et al., 2011).

Como ocorre na maioria das neoplasias, a idade é um fator influente no desenvolvimento das neoplasias mamárias (CARVALHO, 2006). Os riscos para a ocorrência desenvolvimento destas neoplasias aumentam com a idade do animal, sendo que a partir dos 6 anos o animal encontra-se mais susceptível. A faixa etária de maior acometimento é relatada entre 8 e 12 anos (OLIVEIRA, 2003a).

Alguns autores relatam que a predisposição racial não é evidente (QUEIROGA, 2002; QUEIROGA, 2005), embora, de acordo com Sleeckx et al.,

(2011), algumas raças como Poodles, Yorkshire Terriers, Dachshunds e as várias raças Spaniel têm um risco maior de desenvolvimento de neoplasia mamária. Os animais das raças Boxer e Beagle são relatados como aqueles que apresentam menor risco de desenvolverem esse tipo de neoplasia (QUEIROGA, 2002).

No que concerne aos fatores genéticos, sabe-se que algumas alterações genéticas são necessárias para que uma célula normal possa ser transformada em uma célula neoplásica. Nesse caso, alterações na estrutura e função dos genes ocorrem para que haja o desenvolvimento e progressão da neoplasia (PEREZ ALENZA et al., 2000).

Assim como nas neoplasias mamárias em humanos, alterações genéticas moleculares foram observadas em animais, como a superexpressão e mutação do gene p53 e superexpressão do gene c-erbB2 (FERREIRA et al., 2009). Outro estudo indicou que ocorrem alterações genéticas relacionadas com alguns oncogenes e genes supressores de tumor, como o BCRA1 e BCRA2 (RIVERA et al., 2009).

De acordo com esses pesquisadores, os quais avaliaram dez genes descritos no câncer de mama em mulheres, os genes BCRA1 e BCRA2 possivelmente estão associados ao desenvolvimento neoplásico em cães da raça Springer Spaniel Inglês (FERREIRA et al., 2009).

Ainda que haja a evidência destas mutações em tecido neoplásico de mama de cadelas, nem todos os casos apresentam uma mutação genética em comum, o que dificulta a compreensão do comportamento biológico destas neoplasias (SLEECKX et al., 2011).

Outro fator de risco revelado por estudos epidemiológicos é a associação entre neoplasias mamárias e obesidade (PEREZ ALENZA et al., 2000) (CARVALHO, 2006). A alimentação baseada em dieta caseira, normalmente apresentando elevados teores de gordura, foi associada com maior ocorrência de neoplasia mamária em cadelas (DE NARDI et al., 2002).

Ao passo que um estudo realizado por Withrow (2007) demonstrou que cadelas castradas e com baixo escore corporal apresentaram menor incidência de neoplasia mamária.

Os fatores endócrinos ou hormonais são os mais amplamente estudados e têm um papel fundamental na carcinogênese mamária (QUEIROGA et al.,

2009). Dada a importância destes fatores, eles serão abordados de forma mais detalhada, a seguir.

3.2.1 Etiologia Hormonal

A influência hormonal sobre neoplasias mamárias caninas tem sido descrita há vários anos. Tanto em tecido mamário neoplásico normal quanto neoplásico há a presença de receptores de estrógeno e progesterona (THURÓCZY et al., 2007; QUEIROGA et al., 2009; GUIMARÃES, 2012).

O estrógeno induz a proliferação do epitélio ductal das glândulas mamárias e a progesterona induz a proliferação do sistema alveolar, sendo assim, acabam propiciando as condições necessárias para que as mutações genéticas ocorram (FILGUEIRA, 2003).

Como o ciclo estral da espécie canina é caracterizado por uma fase longa sobre efeito da progesterona, que dura cerca de 60 a 100 dias após o início do estro, esse hormônio acaba exercendo um importante papel sobre as glândulas mamárias (FILGUEIRA, 2003).

Estudos demonstraram que a administração de hormônios esteroidais aumenta a ocorrência de neoplasias mamárias (FILGUEIRA, 2003; QUARESMA, 2008). Cadelas que passam por exposição prolongada à progesterona, seja esta exógena ou endógena, possuem maior proliferação do epitélio mamário (ZUCCARI et al., 2001; THURÓCZY et al., 2007).

Estrógeno e progesterona atravessam a membrana celular por processo passivo, ligando-se a receptores protéicos específicos presentes no citoplasma da célula alvo da neoplasia. O complexo esteróide-receptor se move em direção ao núcleo da célula e liga-se à cromatina, promovendo um aumento na síntese de RNA mensageiro e ribossômico e também da síntese protéica, alterando assim a função celular (FONSECA; DALECK, 2000). Ambos os hormônios agem nas células alvo durante os estádios iniciais da carcinogênese mamária (FERRI, 2003).

Geralmente, nos casos de neoplasias benignas, é comum se observar a presença de receptores tanto de estrógeno, quanto de progesterona, enquanto que em neoplasias malignas, normalmente observa-se ausência de receptores de estrógeno e presença apenas de receptores de progesterona. Em casos de

progressão da doença, as neoplasias malignas acabam perdendo sua dependência hormonal, por apresentarem indiferenciação, tornando-se negativa para ambos os receptores (MILLANTA et al., 2005; GUIMARÃES, 2012).

A influência hormonal sobre a carcinogênese mamária pode ser minimizada mediante procedimento cirúrgico precoce de ovário-histerectomia (OH). Quando este procedimento é realizado antes da manifestação do primeiro estro, há baixo risco de desenvolvimento da neoplasia mamária, sendo este de 0,5%. Em fêmeas castradas após o 1º estro, este risco aumenta para 8%; e fêmeas castradas após o 2º estro têm esse risco aumentado para 26%. (FONSECA; DALECK, 2000).

A OH têm sido descrita como uma maneira de prevenir as variações hormonais que acontecem durante o ciclo estral das cadelas e que influenciam no desenvolvimento das neoplasias mamárias. No entanto, tem sido demonstrado que a OH realizada no momento da retirada cirúrgica da neoplasia não tem efeito protetor sobre o surgimento de novas neoplasias ou ocorrência de metástases (FONSECA; DALECK, 2000).

Ainda no que diz respeito à influência hormonal sobre as neoplasias mamárias em cadelas, o papel da prolactina também tem sido investigado (QUEIROGA et al., 2005). Sabe-se que esse hormônio apresenta diversas funções biológicas, como regulação da atividade secretória e participação no desenvolvimento, e diferenciação da glândula mamária (MICHEL, 2012).

Estudos têm demonstrado que, além da hipófise, outros tecidos, incluindo o tecido ósseo e glândulas mamárias, também atuam como produtores da prolactina, que por sua vez, exerce um papel autócrino e/ou parácrino, podendo atuar como fator de crescimento, neurotransmissor ou imunorregulador (QUEIROGA, 2005; MICHEL, 2012).

Além disso, a prolactina estimula o crescimento do tumor mamário devido à sensibilização celular aos efeitos do estrógeno, promovendo um aumento no número de receptores desse hormônio (FONSECA; DALECK, 2000).

Os efeitos da prolactina são mediados pelos seus receptores. Esses receptores foram encontrados em 70 a 100% das neoplasias mamárias e em 90 a 100% dos tecidos mamários normais (MICHEL, 2012). Resultado

divergente foi obtido por (FERREIRA et al., 2008), os quais indicaram que a expressão desses receptores é maior em neoplasias malignas, quando comparadas ao tecido normal.

De forma semelhante, um estudo desenvolvido por Queiroga et al. (2005) também demonstrou que cadelas com neoplasias mamárias possuem níveis mais elevados de prolactina do que aquelas saudáveis.

De acordo com Zuccari (2001) e Oliveira (2003), cadelas que apresentam pseudociese recorrente, possuem níveis mais altos de prolactina, o que predispõe a formação das neoplasias.

De outra forma, a distensão dos ácinos devido ao acúmulo de secreção pode acabar gerando hipóxia celular, levando a formação de radicais livres, que também contribuem com a carcinogênese (FERRI, 2003). No entanto, um estudo desenvolvido por Misdorp (2002) afirma que a pseudociese não tem relação alguma com o desenvolvimento de neoplasias mamárias.

O hormônio de crescimento (GH) também desempenha papel importante na etiologia da neoplasia mamária. O GH é produzido pela glândula pituitária e atua como um fator de crescimento na glândula mamária, contribuindo para a proliferação e diferenciação da mesma durante a fase lútea do ciclo estral e durante o período de gestação. Como em qualquer outro estímulo proliferativo sobre o tecido mamário, há maior suscetibilidade de ocorrer o processo de carcinogênese, sobre uma célula que possui mutação (GUIMARÃES, 2012).

Para que ocorra o estímulo do epitélio mamário, o GH age através da indução de fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-I e IGF-II), sendo que quando ocorre a administração de progestágenos, os níveis desses fatores aumentam na corrente sanguínea (GUIMARÃES, 2012).

Já foi demonstrada a expressão de GH e do seu receptor no tecido mamário normal e neoplásico, sendo que a expressão é maior no tecido neoplásico (GUIMARÃES, 2012).

3.3 INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO SOBRE AS NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Estudos epidemiológicos, experimentais e clínicos têm demonstrado associação entre inflamação crônica e o desenvolvimento de neoplasias

(MURDOCH et al., 2008). Segundo Raica et al. (2009), o infiltrado de células inflamatórias, composto por linfócitos, neutrófilos, macrófagos e mastócitos, ativam vias de sinalização intercelulares, mediadas por moléculas da superfície de adesão, citocinas e seus receptores, que agem em conjunto, favorecendo o processo do desenvolvimento neoplásico e metástase.

Dentre os mediadores inflamatórios que agem favorecendo o câncer, destacam-se as enzimas ciclooxigenases (COX), que são responsáveis pela ciclooxigenação e peroxidação do ácido araquidônico, proveniente da membrana celular, levando à formação de prostaglandinas (JARK et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2014).

Duas formas de COX têm sido identificadas, COX-1 e COX-2. As duas são semelhantes quanto a sua estrutura protéica, mas são produzidas por genes diferentes e apresentam diferentes funções (QUEIROGA et al., 2007). A COX-1 é normalmente expressa em muitos tecidos e tem papel importante nas funções fisiológicas normais, como atuação na função renal, participação no controle de agregação plaquetária e ação sobre a reprodução (MOHAMMED et al., 2004; MILLANTA et al., 2006). A COX-2 não é comumente encontrada em células de tecidos normais, mas pode ser induzida por alguns fatores, como mediadores inflamatórios, fatores de crescimento e hormônios, além de oncogenes e promotores de tumor (QUEIROGA et al., 2007; CLEMENTE et al., 2013).

A superexpressão de COX-2 leva à produção de concentrações elevadas de prostaglandinas, especialmente a prostaglandina E2 (PGE2). Acredita-se que essa prostaglandina aumente a resistência das células neoplásicas à apoptose (MOHAMMED et al., 2004). Conseqüentemente, a maior sobrevivência das células neoplásicas favorece o acúmulo de mutações genéticas sucessivas, contribuindo para a progressão da neoplasia (KANAOKA et al., 2007).

Além disto, a superexpressão da COX-2, e a produção de prostaglandinas, levam a supressão na produção de linfócitos B e T, diminuição na produção de linfocinas, diminuição na formação de células *Natural Killers* (NK), inibição da liberação de interleucinas, levando a síntese de células T não responsivas. Toda essa falha no sistema imunológico favorece o desenvolvimento tumoral (KANAOKA et al., 2007).

Outro mecanismo pelo qual a inflamação atua no desenvolvimento tumoral é a partir do estímulo à angiogênese, que é o crescimento de novos vasos sanguíneos, a partir de vasos preexistentes. Essa capacidade é um mecanismo fundamental para o desenvolvimento tumoral, visto que contribui para o fornecimento de nutrientes e oxigênio para as células neoplásicas e é também uma importante via para disseminação das células durante o processo de metástase (JARK et al., 2011).

A angiogênese é controlada por sinais positivos e negativos veiculados por receptores na superfície das células endoteliais, que se ligam aos fatores solúveis, integrinas, moléculas de adesão e proteases da matriz extracelular. A capacidade para induzir a angiogênese parece ser adquirida através de um desequilíbrio vascular, regulamentado por sinais angiogênicos e antiangiogênicos (HANAHAN et al., 2000).

Nem todas as neoplasias são consideradas angiogênicas desde o início da sua evolução. Sugere-se que as células neoplásicas e inflamatórias adquirem capacidade para secretar fatores angiogênicos no microambiente neoplásico. Segundo Raica et al. (2009), as células neoplásicas estimulam a proliferação e migração de células endoteliais do hospedeiro, fazendo com que se forme uma rede irregular de vasos. As células inflamatórias regulam as funções das células endoteliais e estimulam a liberação de citocina e fatores de crescimento que promovem a angiogênese. Essas células agem em conjunto com células neoplásicas, células do estroma e células endoteliais (SLEECKX, VAN BRANTEGEM, FRANSEN, et al., 2013).

A avaliação da angiogênese mediante o uso de marcadores tem sido tema de grande interesse tanto na medicina humana, quanto na veterinária (SLEECKX, VAN BRANTEGEM, FRANSEN, et al., 2013). Um dos métodos utilizados para quantificar a densidade de microvasos (DMV) presentes na região intratumoral é a avaliação da expressão do antígeno CD31, que é uma glicoproteína presente na membrana e encontra-se nas junções intercelulares das células endoteliais e na superfície de plaquetas e leucócitos (LAVALLE et al., 2009; QUEIROGA et al., 2011; SLEECKX, VAN BRANTEGEM, VAN DEN EYNDEN, et al., 2013).

Analisando a expressão de COX-2 e CD31, em 46 casos de carcinoma mamário canino, Lavalle et al. (2009) verificaram a imunorreatividade em 100%

dos casos, para ambos os marcadores. Foi observada maior expressão da COX-2 no grupo histológico correspondente ao carcinoma ductal em comparação ao grupo metaplásico, sendo que no primeiro grupo os animais apresentaram menor sobrevida. Para a marcação do CD31, não houve associação com o grupo histológico. Em análise de correlação entre estes dois marcadores, houve correlação positiva entre a expressão da COX-2 e a marcação por CD3, mas não houve correlação entre estes marcadores e o grupo histológico.

Outro marcador utilizado como parâmetro para a avaliação da angiogênese é o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Este fator age na proliferação e migração de células endoteliais (TSOLI et al., 2002), além de impedir a regressão dos vasos recém-formados e aumentar a permeabilidade microvascular (QUEIROGA et al., 2011).

O VEGF exerce a sua função nas células endoteliais através da ligação com dois receptores de alta afinidade, o Flt-1, ou receptor 1 do VEGF, e o KDR, ou receptor 2 do VEGF. A alta expressão do VEGF nas células neoplásicas estimula o aumento desses receptores nas células, embora outros fatores, como hipóxia e presença de citocina, também possam ocasionar esse aumento (MILLANTA et al., 2006).

A expressão de VEGF tem sido associada com um maior risco de metástases e pior prognóstico em várias neoplasias humanas, incluindo câncer de mama (SANTOS et al., 2010). Queiroga et al. (2011) relataram que a expressão da COX-2 e do VEGF constituem-se como importantes mediadores da angiogênese, em neoplasias mamárias caninas, e que há associação da alta expressão destes marcadores com neoplasmas malignos.

De acordo com Queiroga (2005), verificou-se que existe correlação entre as características da neoplasia e os níveis de COX-2, assim sendo, neoplasias de grande tamanho, apresentando ulceração, aderidas à pele e com tipos histológicos mais agressivos, possivelmente apresentarão maior índice de expressão dessa enzima.

Diante destas evidências, alguns autores sugerem que as expressões de COX-2 e VEGF sejam utilizadas como fatores de prognóstico para neoplasias mamárias caninas (LAVALLE et al., 2009; CASSALI, Geovanni D. et al., 2011; QUEIROGA et al., 2011).

Entretanto, nem todos os autores verificaram resultados similares. Millanta et al. (2006a) demonstraram que o aumento da expressão do VEGF não se correlaciona com variáveis clínico-patológicas ou com o prognóstico. Estes resultados revelam a necessidade de mais estudos sobre o tema.

3.4 AVALIAÇÃO CLINICO-PATOLÓGICA

Estima-se que aproximadamente 60% das neoplasias localizam-se nas glândulas inguinais, devido ao maior volume destas glândulas e por possuírem maior concentração de receptores hormonais (CARVALHO, 2006; GONÇALVES, 2008).

De acordo com um trabalho realizado por Oliveira Filho et al. (2010), onde foram analisadas 85 cadelas com histórico de neoplasia mamária, as neoplasias compreendidas nas glândulas torácicas corresponderam a 5,9% dos casos, enquanto que nas glândulas inguinais esse índice foi de 51,8%.

Ressalta-se que um mesmo indivíduo pode apresentar mais de uma neoplasia. Neste sentido, estima-se que cerca de 60% das cadelas têm neoplasia em mais de uma mama (OLIVEIRA FILHO et al., 2010).

Há grande variação no tamanho das neoplasias, que podem apresentar-se na forma de pequenos nódulos com 0,5 cm de diâmetro, até tumores com mais de 10 cm. A maioria dos tumores benignos é pequeno, com menos de 3 cm, bem circunscrito e firme à palpação. Já os tumores malignos normalmente têm tamanho superior a 5 cm, estão aderidos aos planos profundos e podem apresentar ulceração cutânea (GONÇALVES, 2008). Alguns animais apresentam sinais evidentes de inflamação, como é o caso do carcinoma inflamatório.

É muito importante que seja feita avaliação clínico-patológica dos pacientes, de forma individualizada, pois a partir dessa avaliação, pode-se prever o comportamento e a evolução clínica das neoplasias mamárias e, desta maneira, utilizar corretos procedimentos terapêuticos para cada caso e de forma eficaz (CASSALI et al., 2010).

3.4.1 Avaliação Histopatológica

A análise histopatológica é uma ferramenta valiosa para prever o comportamento biológico das neoplasias mamárias e tem como objetivo avaliar a arquitetura das mesmas. Também constitui-se como um exame essencial para determinar a presença de metástases, que em neoplasias mamárias caninas ocorrem mais frequentemente em linfonodos, pulmões, fígado e baço (GUIMARÃES, 2012). O tipo histológico apresenta uma correlação significativa com a agressividade da neoplasia (CASSALI, Geovanni D. et al., 2011).

Este exame possibilita a classificação das neoplasias em benignas ou malignas (CASSALI, Geovanni D. et al., 2011). Como critérios de malignidade considera-se a alta celularidade com baixo grau de coesão, pleomorfismo celular, anisocitose e anisocariose, figuras de mitose, típicas ou atípicas, nucléolos evidentes e diferentes padrões de cromatina, que pode se apresentar de forma densa ou frouxa (CARVALHO, 2006).

São também avaliadas informações adicionais, tais como, a presença ou ausência de necrose tumoral, modo de crescimento do tumor (expansivo ou infiltrativo) e a caracterização de infiltrados celulares inflamatórios (tipo do infiltrado e grau de infiltração) (GAMA et al., 2008).

A partir destas informações, é possível determinar a classificação histopatológica das neoplasias mamárias caninas. Os métodos de classificação variam consideravelmente. Como forma de padronização, foi recomendada a utilização da classificação desenvolvida por Misdorp et al. (1999), modificada por Cassali et al. (2011), de acordo com o Consenso para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de tumores mamários caninos (figura 2).

| |
|--|
| <p><u>Non-neoplastic epithelial lesion</u></p> <p>Epithelial hyperplasia</p> <ul style="list-style-type: none"> Ductal hyperplasia Lobular Hyperplasia Adenosis <p>Columnar cell lesions</p> <ul style="list-style-type: none"> Columnar cell alteration Columnar cell hyperplasia Atypical columnar cell lesions <p><u>Benign tumors</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Adenoma Complex adenoma or adenomyoepithelioma Basaloid adenoma Fibroadenoma Mixed benign tumor Ductal papilloma <p><u>Malignant tumors</u></p> <p>Carcinomas</p> <ul style="list-style-type: none"> Carcinomas <i>in situ</i> <ul style="list-style-type: none"> Ductal Carcinoma <i>in situ</i> Lobular Carcinoma <i>in situ</i> Mixed tumor carcinoma Complex carcinoma or malignant adenomyoepithelioma Papillar carcinoma Tubular carcinoma Solid carcinoma <p>Special type carcinomas</p> <ul style="list-style-type: none"> Micropapillar carcinoma Invasive lobular carcinoma Pleomorphic lobular carcinoma Secretory carcinoma Mucinous carcinoma Lipid-rich carcinoma Squamous cell carcinoma Spindle-cell carcinoma Anaplastic carcinoma Mammary neoplasms with sebaceous differentiation <p>Sarcomas</p> <ul style="list-style-type: none"> Fibrosarcoma Osteosarcoma Carcinosarcoma Mixed tumor sarcomas <p>Other sarcomas</p> <ul style="list-style-type: none"> Pure Condrosarcoma Liposarcoma Hemangiosarcoma |
|--|

Figura 2. Classificação Histológica das Neoplasias Mamárias Caninas

Fonte: CASSALI et al., 2011.

3.4.2 Avaliação Imunohistoquímica

O método de imuno-histoquímica constitui-se como um exame complementar que pode ser utilizado para o auxílio no diagnóstico das neoplasias mamárias caninas, bem como para prever o prognóstico destes casos (QUEIROGA, 2002).

Os anticorpos comumente empregados na técnica de imuno-histoquímica para a avaliação das neoplasias mamárias são os receptores hormonais (receptores de estrógeno e receptores de progesterona), que associam-se com o grau de diferenciação da neoplasia; os marcadores de proliferação celular (Ki67 e PCNA), os quais determinam o índice de proliferação das células neoplásicas; a expressão de COX-2; e os marcadores de angiogênese (CD31 e VEGF) (CASSALI et al., 2010).

As informações acerca da expressão destes marcadores em neoplasias mamárias caninas e a sua associação com o prognóstico foram descritas anteriormente

3.5 MODALIDADES DE TERAPIA

A excisão cirúrgica é o tratamento de eleição para as neoplasias mamárias caninas, com exceção dos carcinomas inflamatórios. As opções de técnica cirúrgicas compreendem: nodulectomia, mamectomia, mastectomia em bloco e mastectomia total uni ou bilateral (figura 3).

A escolha da técnica cirúrgica mais adequada depende do número de tumores e da sua localização na cadeia mamária, das características clínicas da neoplasia (tamanho, aderência, ulceração) e do estado clínico do paciente (QUEIROGA, 2002) (CIRILLO, 2008).

Quando várias glândulas de uma mesma cadeia mamária são acometidas, deve-se optar pela mastectomia radical, devido à complexidade da drenagem linfática. Caso seja necessário realizar mastectomia total bilateral, esta deve ser feita em dois tempos operatórios, com intervalo de 3 a 4 meses, para que haja correta cicatrização, evitando assim complicações pós-cirúrgicas (QUEIROGA, 2002).

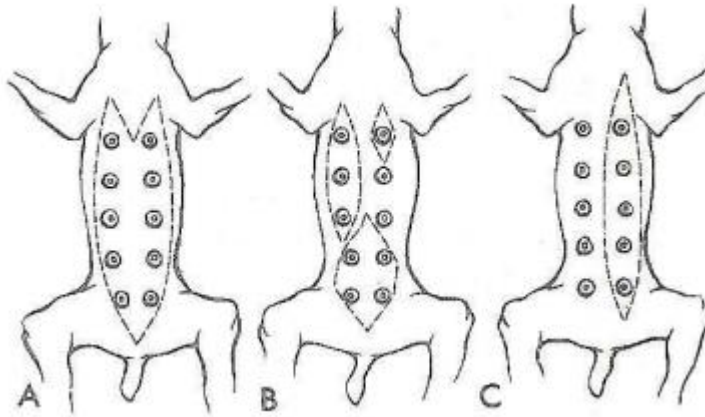


Figura 3. Variações nas opções de ressecção cirúrgica. A- Mastectomia total. B- Mastectomia em bloco. C- Mastectomia unilateral.

Fonte: SLATTER (1998).

É necessário que o procedimento cirúrgico seja feito com ampla margem de segurança, 2 cm em torno do tumor, para que haja o controle local deste, garantindo assim uma maior sobrevida para os animais acometidos (GREEN et al., 2009). Da mesma maneira, a remoção dos linfonodos regionais deve ser realizada, caso haja acometimento dos mesmos (TUOHY et al., 2009)

3.5.1 Quimioterapia

A quimioterapia é indicada como tratamento adjuvante da doença sistêmica ou metastática, e não deve ser utilizada como terapia única, e sim associada à cirurgia. Esta terapia objetiva evitar recidiva local, o aparecimento de metástases e eliminar célula neoplásica residual, que possa existir após a excisão cirúrgica do tumor (CIRILLO, 2008).

As drogas quimioterápicas de escolha para o tratamento das neoplasias mamárias são a doxorrubicina, a ciclofosfamida e o 5-Fluorouracil (NELSON et al., 2006). De acordo com Queiroga et al. (2002), os quimioterápicos têm demonstrado eficácia como terapia adjuvante, mas não há estudos clínicos que indiquem qual a melhor droga, ou o melhor protocolo terapêutico, para os diferentes tipos de neoplasias mamárias.

Considerando a heterogeneidade das apresentações histopatológicas, esta quimiossensibilidade é difícil de ser caracterizada. Além disto, em casos

de metástases, estas podem apresentar características distintas do tumor primário, reagir de forma diferente à quimioterapia (CIRILLO, 2008).

Outro ponto a ser considerado sobre a terapia quimioterápica é a toxicidade decorrente de seu uso. Os quimioterápicos não atuam somente sobre as células neoplásicas, agindo sobre qualquer células em intensa atividade proliferativa, como o epitélio das vilosidades intestinais, células da medula óssea e epitélio dos folículos pilosos. Por este motivo, a mielossupressão, sinais gastrointestinais e alopecia são efeitos colaterais comumente observados em animais submetidos a esse tipo de tratamento (NELSON et al., 2006).

3.6 USO DE INIBIDORES DA COX-2 NO TRATAMENTO DAS NEOPLASIAS MAMÁRIAS

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados na prática da medicina veterinária, devido a sua ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética (STEAGALL et al., 2007a).

O principal mecanismo de ação dos AINEs é a inibição da expressão das enzimas COX, em membranas celulares, podendo ser de forma não específica ou específica (STEAGALL et al., 2007b). Exemplos de AINEs não específicos são aspirina, indometacina, fenilbutazona, cetoprofeno, meclofenamato, meloxicam, carprofeno; e os inibidores específicos da COX-2 são valdecoxibe, rofecoxibe, lumaricoxibe, etoricoxibe, firocoxibe (JARK et al., 2011).

A relação do uso de inibidores da COX-2 e sua expressão foi relatado em um estudo feito por Tsjui et al. (1997), no qual observou-se que a expressão de COX-2 em células de câncer de cólon em humanos era elevada e que essa alteração pode ser revertida através do uso de inibidores da COX.

Em estudo semelhante, desenvolvido por Mohammed et al. (2012), verificou-se que houve diminuição de 40-50% do risco de desenvolvimento de câncer de cólon e reto em pessoas que usavam regularmente antiinflamatórios não-esteroidais.

Na medicina humana tem sido descrito que neoplasias mamárias em mulheres apresentam elevados níveis de COX-2 (DENKERT et al., 2003). Em

semelhança a essas neoplasias, a presença da enzima COX-2 em neoplasias mamárias caninas tem sido descrita por diversos autores (DORÉ, et al., 2003; HELLER et al., 2005; QUEIROGA et al., 2005), sendo que há relatos de que a expressão dessa enzima é maior em neoplasias malignas (QUEIROGA et al., 2005; MILLANTA et al., 2006).

Em neoplasias mamárias caninas, o uso de inibidores da COX-2 tem sido proposto como terapia preventiva ou adjuvante (CASSALI, Geovanni D. et al., 2011; DE NARDI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012; XU et al., 2014). Devido à sua elevada seletividade para a COX-2, acredita-se que o efeito antitumoral destes é mais potente do que os AINEs tradicionais e, além disso, estes proporcionam menos efeitos colaterais ao paciente (DE NARDI et al., 2011).

De acordo com Knudsen et al. (2013), a primeira evidência dos efeitos anti-neoplásicos dos inibidores da COX-2 foi relatada por Knapp et al. (1992), os quais avaliaram o efeito do piroxicam em 62 cães portadores de neoplasias, sendo que, em neoplasias de 8 animais foi observada remissão parcial.

Souza, et al. (2009), fizeram uso do inibidor da COX-2, piroxicam, em sete cadelas diagnosticadas com carcinoma inflamatório. Os animais tratados apresentaram melhora da resposta clínica da neoplasia, com diminuição do eritema, edema e dor, e também aumentando a sobrevida, em comparação ao grupo tratado com doxorrubicina. Mesmo apresentando resposta clínica, 65,72% das amostras neoplásicas apresentaram imunorreatividade para a expressão da COX-2, após o uso de inibidores desta enzima.

Lavalle et al. (2012) desenvolveram um estudo no qual avaliaram a sobrevida de cadelas portadoras de neoplasias mamárias, que foram submetidas a quatro diferentes tipos de (G1) excisão cirúrgica; (G2) excisão cirúrgica + carboplatina; (G3) excisão cirúrgica + carboplatina + piroxicam; e (G4) excisão cirúrgica + carboplatina + firocoxibe. Os grupos que receberam carboplatina, associada ou não aos AINES, apresentaram taxa de sobrevida maior quando comparada aos animais que só passaram pelo procedimento cirúrgico.

O firocoxibe é um potente AINE desenvolvido especificamente para uso veterinário, apresentando de 350 a 430 vezes maior seletividade para COX-2. As concentrações plasmáticas de firocoxibe, em animais seguindo o protocolo

terapêutico apropriado, são capazes de inibir a COX-2 causando pouco impacto sobre a atividade da enzima COX-1 (STEAGALL et al., 2007a).

Em experimento com cães saudáveis, Steagall et al. (2007) constataram que a administração oral de 5,3 mg/kg de firocoxib não acarretou em alterações no hemograma, bioquímica sérica, agregação plaquetária e tempo de coagulação. Também não promoveu aparecimento de lesões gástricas ou sangue oculto fecal, demonstrando ser uma dose sem efeitos colaterais.

Diante das características de seletividade do firocoxibe, seu uso para o tratamento de neoplasias mamárias caninas deve ser avaliado, tanto para determinar com precisão as melhores doses e as melhores formas de administração (DE NARDI et al., 2011), quanto para que sejam avaliados os efeitos deste tratamento sobre a expressão das enzimas COX-2 no tecido tumoral.

4. METODOLOGIA

a. Aspectos Éticos

Esse estudo esteve de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Santa Cruz (CEUA – UESC), aprovado com o protocolo nº 010/13.

O consentimento de participação dos animais foi conferido por seus proprietários, que após serem informados sobre a natureza da pesquisa, procederam com a assinatura do Termo de Ciência e Autorização.

b. Delineamento Experimental

Compuseram este estudo amostras de tecido neoplásico mamário de cadelas, provenientes de dois grupos de tratamento: Grupo 1: cadelas tratadas com firocoxibe¹ e Grupo 2: cadelas não tratadas com firocoxibe, conforme descrito a seguir:

Grupo 1

Foram selecionadas cadelas atendidas no Ambulatório Clínico de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UESC – Ilhéus, durante o período de Agosto à Novembro de 2013, que possuíam alterações clínico-patológicas compatíveis com neoplasia mamária.

A princípio, 30 cadelas foram selecionadas. No entanto, após a realização de exames complementares, foram excluídas aquelas que apresentaram algum tipo de doença concomitante, e também aquelas que apresentavam evidência de metástases, mediante exames complementares. Dessa forma, o Grupo 1 consistiu de 14 (quatorze) animais.

Foram coletados dados acerca da identificação e histórico do paciente, tais como raça, idade, peso, início das lesões, regularidade e intervalo de ciclo estral, estado reprodutivo (castradas ou não), uso de progestágenos exógenos, manifestação de pseudociese e lesões tumorais anteriores.

Procedeu-se também com a realização do exame físico, sendo avaliada a condição sistêmica do animal e específica da neoplasia. Neste sentido, fez-se o mapeamento da localização da neoplasia na cadeia mamária; avaliação da consistência; presença ou ausência de aderência à musculatura; presença ou ausência de ulceração e secreção; avaliação de linfonodos regionais e mensuração dos diâmetros tumorais, com auxílio de paquímetro (figura 4).



Figura 4. Mensuração de neoplasia mamária.

Fonte: Arquivo pessoal.

Após a mensuração, o maior diâmetro foi considerado como referência para o tamanho do tumor, sendo este parâmetro categorizado em três níveis: T1 (<3 cm); T2 (3 a 5 cm) e T3 (>5 cm) (QUEIROGA et al., 2011).

Realizaram-se ainda exames complementares, como hemograma, perfil bioquímico para dosagem de ureia, creatinina, alanina amino transferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST), radiografia torácica em duas projeções (lateral esquerda e ventro-dorsal) e ultrassonografia de mama e abdominal, para investigação de possíveis metástases.

Os exames de hemograma foram realizados com o auxílio do equipamento Abbreviated Blood Counter Vet (ABC Vet) e a realização dos exames bioquímicos foi feita utilizando o equipamento BioPlus 2.000 bio f semi-automático e kits da marca Doles, disponíveis no Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da UESC.

Procedeu-se com os exames radiográficos utilizando o equipamento Unidade Radiológica Transportável Modelo Med 300mA/125Kv e as revelações foram feitas em tanque de revelação Triplex Inox 13x40x13L. Os exames ultrassonográficos foram feitos utilizando o equipamento Ultra Vision Flip Vet.

Não havendo alterações clínicas que inviabilizassem a permanência das cadelas no experimento, as mesmas iniciaram a terapia com firocoxibe (5 mg/kg, a cada 24 horas, por via oral), durante 30 dias. Durante este período, os animais foram monitorados em três momentos: início do tratamento (1º dia), quinze dias após o início da medicação (15º dia) e término do tratamento (30º dia). As avaliações consistiam em exame físico, com medição das neoplasias, e coleta sanguínea, para realização de exames hematológicos e bioquímicos, conforme descrito acima.

Após esse período, os pacientes foram encaminhados à cirurgia, sendo realizada a mastectomia parcial ou total da cadeia mamária. Quando necessário, realizou-se também a remoção de linfonodos regionais.

Em situações em que ambas as cadeias mamárias, direita e esquerda, eram acometidas, no primeiro procedimento cirúrgico, executou-se a mastectomia do lado que apresentava nódulos com maior dimensão. Nos casos em que havia mais de um nódulo localizado em um lado da cadeia mamária, todos eram removidos, coletados e processados de forma individual. Nesta condição, um mesmo animal apresentou mais de uma amostra de fragmento neoplásico para a análise.

Amostras dos materiais excisados foram coletadas e mantidas em formalina tamponada 10%, durante 48 horas. Após esse período, as amostras foram seccionadas em 4mm, inclusas em parafina e armazenadas em blocos para a desidratação, para posteriores análises.

Grupo 2

Os casos do grupo 2 foram provenientes de um estudo retrospectivo utilizando blocos de parafina contendo amostras de neoplasias mamárias, selecionados do arquivo do Setor de Patologia Animal da UESC.

Em semelhança aos dados registrados para os animais do Grupo 1, foram obtidas dos prontuários as informações pertinentes ao histórico, exame

físico e exames complementares. Foram selecionados apenas animais cujo histórico e terapia prescrita não constava o relato do uso de AINES, no período que antecedeu à coleta do fragmento neoplásico. Segundo este critério, amostras pertencentes a doze animais foram selecionados, com quatorze amostras de tecido neoplásico mamário.

c. Processamento de material e análise por H&E

Foi realizado o processamento histopatológico de rotina para coloração por hematoxilina e eosina (HE), das amostras de ambos os grupos, segundo os critérios estabelecidos por Luna, (1968). Os fragmentos foram analisados utilizando microscópio óptico (40x) e a classificação histopatológica das neoplasias foi feita por dois observadores, baseando-se nos critérios propostos pelo Consenso para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Neoplasia Mamária Canina, de acordo com Cassali et al. (2011).

Em uma etapa subsequente à classificação, como forma de viabilizar a análise dos dados, os tipos histopatológicos foram agrupados em: Carcinoma in situ (CIS); Carcinoma simples (carcinoma tubular, carcinoma tubular, carcinoma túbulo-papilar); Carcinoma em tumor misto; e Carcinossarcoma.

d. Processamento e análise de Imunohistoquímica

Para detecção dos marcadores COX-2 e VEGF, realizou-se a técnica de imunohistoquímica, pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase (ABC), utilizando um sistema de detecção comercial (tabela 1).

Tabela 1. Relação dos anticorpos primários, clone, marca do anticorpo e diluição utilizada nos cortes de neoplasias mamárias de cadelas.

| ANTICORPO | CLONE | MARCA | DILUIÇÃO |
|-----------|--------|-------|----------|
| VEGF | VG1 | DAKO | 1:100 |
| COX-2 | CX-294 | DAKO | 1:100 |

O processamento foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada do serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), USP – SP, utilizando o protocolo determinado pelo laboratório (ANEXO 1).

As amostras foram seccionadas em cortes de 4,0 µm de espessura e montadas em lâminas de vidro devidamente preparadas, para que o material ficasse bem aderido à lâmina, evitando assim, perda de material durante o processamento.

Os cortes foram submetidos à desparafinização e reidratação e o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com solução de água oxigenada 30% em metanol por 60 minutos. A recuperação antigênica para todos os anticorpos primários foi realizada com tampão EDTA pH 9,0 em panela de pressão, durante 5 minutos.

Foram utilizados como controle positivo, tecido renal de cão, que expressa a COX-2 na mácula densa e nas células intersticiais; e que expressa o VEGF em podócitos, túbulos distais e coletores.

Os cortes utilizados como controle negativo foram escolhidos aleatoriamente dentre os blocos pertencentes aos animais do Grupo 1. Nestes cortes, o anticorpo primário foi substituído por tampão fosfato salino (PBS) com pH=7,4.

Resumidamente, para o processamento da técnica da Imunohistoquímica, as amostras foram incubadas com anticorpos específicos para COX-2 e VEGF, sendo estes, anticorpos primários diluídos em BSA (1% + NaN₃ 0,1%), permanecendo durante a noite, em temperatura de 4°C. Passado esse período, as amostras foram lavadas e incubadas durante 45 min com um anticorpo secundário, no caso, o LSAB.

Para que a imunorreatividade pudesse ser visualizada, foi utilizado o cromógeno diaminobenzidine (DAB), o qual confere às células imunorreativas, coloração marrom, e, posteriormente, as lâminas foram contrastadas com hematoxilina, que confere coloração roxa às células negativas.

Para avaliação das amostras, utilizou-se microscópio óptico (Olympus DP 71), nas objetivas 20x e 40x, com auxílio do programa de análise de imagens *Image Pro-express 6.0*. As análises foram feitas após a localização

dos focos de cada lesão e foram atribuídas escalas de marcação para cada um dos anticorpos utilizados.

A expressão da COX-2 foi identificada através da coloração castanha expressa na membrana ou no citoplasma de células epiteliais. A classificação foi feita segundo os critérios estabelecidos por Lavallo, et al., (2009), baseada em um escore imuno-histoquímico, que considera a distribuição (percentual de células marcadas) e a intensidade de marcação das mesmas.

Para a avaliação do percentual de distribuição de imunorreatividade, foram percorridos todos os campos da lâmina que apresentavam evidência de alteração neoplásica em ampliação (20x). O resultado foi expresso em escore, variando de 0 a 4, em que 0 significa 0%, 1 significa <10% de células marcadas, 2 corresponde a 10-30% de marcação, 3 para 31-60% e 4 para > 61% de células marcadas.

Os valores para a intensidade da coloração variam de 0-3, em que 0 significa nenhuma intensidade (-), 1 é equivalente a intensidade fraca (+), 2 corresponde a intensidade moderada (++) e 3 equivale a intensidade forte (+++). A pontuação final foi obtida multiplicando o percentual de distribuição de imunorreatividade e da intensidade de marcação, com variação de 0 a 12.

A expressão do VEGF foi caracterizada pela presença de coloração citoplasmática castanha das células epiteliais. O número de células imunorreativas foi avaliado semi-quantitativamente de acordo com o método descrito por Santos et al., (2010), utilizando também o escore imuno-histoquímico, levando em consideração o percentual de células positivas e sua intensidade de marcação.

A avaliação da intensidade foi dada através das pontuações: 0 equivale a nenhuma intensidade; 1 – fraca; 2 – moderada; 3 – forte. Já a distribuição das células positivas ocorre da seguinte maneira: 1 equivale a <25% de células positivas; 2 – 25-50%; 3- 50-75% e 4- >75% de células positivas. O score foi obtido através da multiplicação dos valores de distribuição e intensidade de marcação.

Após se obter o score final, as variáveis foram categorizadas em score baixo (0 a 5) ou score alto (6 a 12), de acordo com Lavallo et al., 2009.

e. Análise Estatística

A variação de distribuição de imunorreatividade e intensidade para expressão da COX-2 e VEGF entre os grupos foi analisada utilizando-se o teste de Mann-Whitney, estudando as variáveis categóricas. Para a análise de correlação entre estes marcadores foi utilizado o teste de Spearman. O teste de Kruskal-Wallis foi empregado para avaliar a associação da COX-2 e VEGF com as variáveis clínico-patológicas.

Em todas as comparações estatísticas, um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism (GraphPad Prism version 6.00 for Windows).

5. RESULTADOS

5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Considerando a faixa etária de todos os animais selecionados nesse estudo, observou-se a ocorrência de neoplasia mamária em cadelas entre seis a 15 anos de idade. A média de idade dos animais componente do grupo 1 foi de 10 anos, e nos animais do grupo 2 foi de 9 anos.

Com relação à raça, 36% dos animais do grupo 1 eram sem raça definida (SRD), seguidos pelos cães das raças Poodle (14,3%), Boxer (14,3%), Fox Paulistinha (14,3%) e Rottweiler (14,3%). Referente ao grupo 2, os animais da raça Poodle e SRD foram maioria, correspondendo a 30,7% cada, seguidos pela da raça Rottweiler (15,4%). As raças Pinscher, Akita e Pastor Alemão foram equivalentes a 8% dos casos.

No histórico dos animais pertencente ao grupo 1, foi possível constatar que 42,9% dos animais apresentaram irregularidade no ciclo estral, 28,6% possuíam histórico de pseudociese, 21,4% haviam relatado uso de progestágenos exógenos e 92,8% não eram castrados. Para as cadelas componentes do grupo 2, estas informações não constavam no prontuário, não sendo possível analisá-las.

Em relação às características da neoplasia, o tempo decorrido entre o aparecimento da lesão e o encaminhamento ao atendimento veterinário variou de 1 a 18 meses, no grupo 1 (média de 9,5 meses), e de 2 a 24 meses, no grupo 2 (média de 8,1 meses). A localização das neoplasias foi predominante nas mamas abdominais, seguidas das mamas inguinais, tanto nos animais do grupo 1 quanto nos do grupo 2 (figura 5). O aspecto macroscópico das lesões foi variável, havendo ulceração cutânea em 14,3 % dos casos dos animais do grupo 1, e em 20 % dos animais do grupo 2. O tamanho das lesões variou entre 0,5 cm a 10 cm (grupo 1) e 1,5 cm a 17 cm (grupo 2).

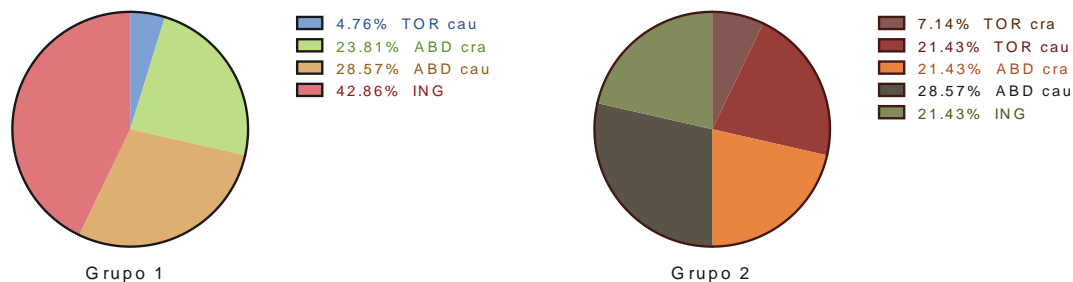


Figura 5. Localização das neoplasias na cadeia mamária das cadelas tratadas com firocoxibe (grupo 1) e das cadelas não tratadas com firocoxibe (grupo 2).

Em relação à resposta clínica dos animais tratados com firocoxibe, em 28,57% foi constatada redução do diâmetro tumoral, após 30 dias de tratamento, em porcentagens que variaram entre 5,1 a 40%, em relação ao parâmetro inicial. Em 66,66% dos casos a redução foi inferior a 5%, e em um caso (4,76%), houve aumento de 10 % do diâmetro tumoral, em relação ao início do tratamento (tabela 2). Não foi identificada diferença significativa entre os valores iniciais e finais dos diâmetros.

Nenhum dos proprietários relatou alterações clínicas, em decorrência do uso do firocoxibe. Em análise dos resultados dos hemogramas e exames bioquímicos seriados, observou-se que sete (50%) animais apresentaram valores de ureia sérica um pouco acima do preconizado por Kaneko et al. 1997. No entanto, três cadelas (21,4 %) apresentaram valores altos de ureia apenas no dia 0, três cadelas (21,4 %) apresentaram valores acima da referência apenas no dia 15 e/ou 30 e uma cadela apresentou valores altos em momentos antes e após o uso do firocoxibe. Nos demais exames hematológicos e bioquímicos (Creatinina, ALT e AST), não foram observadas alterações, em relação aos parâmetros de normalidade para a espécie.

Tabela 2. Mensuração do maior diâmetro tumoral (cm), no decorrer da terapia com firocoxibe (5 mg/kg/24 horas, durante 30 dias), em cadelas com neoplasia mamária.

| Lesão | DIÂMETRO (cm) | | |
|-------|---------------|---------|---------|
| | 1 dia | 15 dias | 30 dias |
| 1 | 10 | 9 | 7 |
| 2 | 1 | 1 | 1 |
| 3 | 3 | 3 | 3 |
| 4 | 5,1 | 5 | 4,8 |
| 5 | 3 | 3 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 10 | 10 | 9,8 |
| 8 | 5,1 | 5 | 5 |
| 9 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| 10 | 2,5 | 2,5 | 2,5 |
| 11 | 1,5 | 1,5 | 1,4 |
| 12 | 8,5 | 8,1 | 7,9 |
| 13 | 5 | 5 | 5,5 |
| 14 | 2 | 1,8 | 1,2 |
| 15 | 1 | 1 | 1 |
| 16 | 2 | 2 | 2 |
| 17 | 1 | 1 | 1 |
| 18 | 5,5 | 5,4 | 5,3 |
| 19 | 2 | 2 | 2 |
| 20 | 5 | 4,9 | 4,9 |
| 21 | 8 | 7 | 5 |

5.2 ANÁLISE DESCRITIVA DAS AMOSTRAS

Nesse estudo, foram avaliadas 33 amostras de neoplasias mamárias, sendo um tumor benigno e 32 tumores malignos, de acordo com o diagnóstico histopatológico. Houve predomínio do tipo carcinoma tubular (22%) (figura 6a), seguido por carcinoma tubular com áreas papilares (figura 6b), carcinoma papilar (figura 6c), carcinoma em tumor misto (figura 6d) e carcinoma ductal *in situ*, com a ocorrência de 9,5% cada.

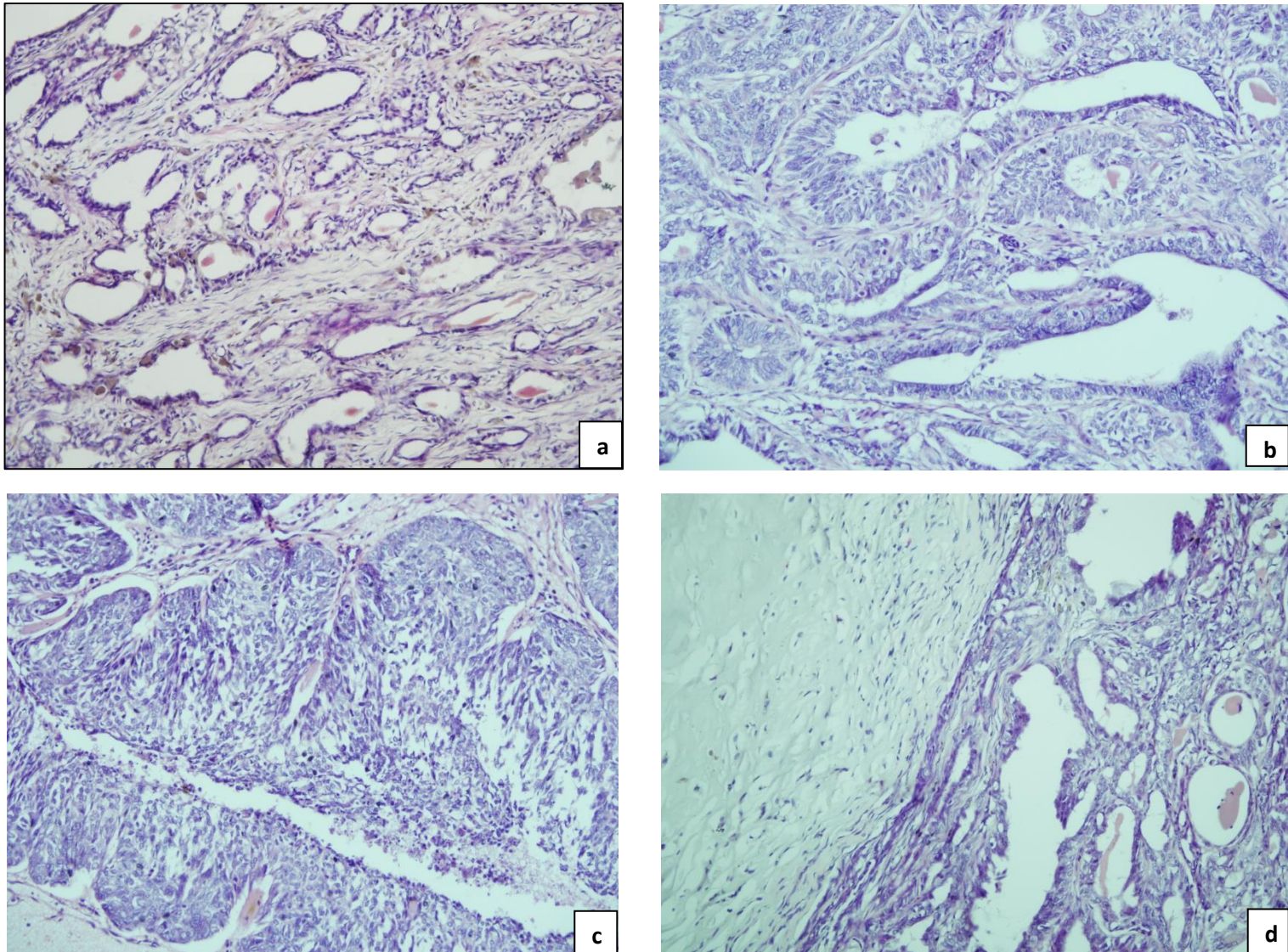


Figura 6. Amostras histopatológicas de fragmentos neoplásicos retirados de cadelas com neoplasias mamárias. (a) Carcinoma tubular. HE. 20x. (b) Carcinoma tubular com áreas papilares. HE. 20x. (c) Carcinoma papilar. HE. 20x. (d). Carcinoma em tumor misto. HE. 20x.

5.3 EXPRESSÃO DA COX-2 EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

Observou-se que houve expressão da COX-2, em ambos os grupos (tabela 3 e 4). A imunorreatividade para a COX-2 foi observada, predominantemente, no citoplasma das células epiteliais, de forma difusa ou focal (figura 7 e 8). No entanto, em alguns casos, observou-se também marcação nuclear e marcação em células mioepiteliais (figura 7 e 9).

Tabela 3. Avaliação da expressão da COX-2 e VEGF em tumores mamários caninos dos animais pertencentes ao grupo tratado com firocoxibe (Grupo 1).

| AMOSTRA | DIAGNÓSTICO | COX-2 | | | VEGF | | |
|---------|-------------------------------|-------|-------------|-----------|------|-------------|----------|
| | | GRAU | INTENSIDADE | ESCORE | GRAU | INTENSIDADE | ESCORE |
| 1 | Carcinoma ductal in situ | 4 | 3 | 12 | 4 | 2 | 8 |
| 2 | CT com áreas papilares | 4 | 2 | 8 | 4 | 2 | 8 |
| 3 | CT com áreas papilares | 3 | 2 | 6 | 4 | 2 | 8 |
| 4 | Carcinoma em tumor misto | 4 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | CDIS em tumor misto | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | CLIS c/ microinvasão | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | CP não invasivo | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | CLIS c/ áreas de microinvasão | 4 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | Carcinoma tubular | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | 2 |
| 10 | Carcinoma ductal in situ | 3 | 2 | 6 | 3 | 3 | 6 |
| 11 | Carcinoma ductal in situ | 3 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 12 | Carcinoma em tumor misto | 3 | 2 | 6 | 3 | 3 | 9 |
| 13 | Carcinoma tubular | 3 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | Carcinoma tubular | 4 | 2 | 8 | 4 | 2 | 8 |
| 15 | CDIS c/microinvasão | 4 | 2 | 8 | 4 | 2 | 8 |
| 16 | Carcinoma tubular | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 4 |
| 17 | Carcinoma tubular | 3 | 3 | 9 | 4 | 1 | 8 |
| 18 | Carcinoma tubular | 3 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 19 | Carcinoma tubular | 3 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 4. Avaliação da expressão da COX-2 e VEGF em tumores mamários caninos dos animais pertencentes ao grupo não tratado com firocoxibe (Grupo 2).

| AMOSTRA | DIAGNÓSTICO | COX-2 | | | VEGF | | |
|---------|---|-------|-------------|----------|------|-------------|----------|
| | | Grau | Intensidade | Escore | Grau | Intensidade | Escore |
| 1 | Tumor misto benigno | 4 | 2 | 8 | 3 | 2 | 6 |
| 2 | CT com áreas papilares | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 3 | CP c/ áreas tubulares e microp. | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 4 | CP invasor c/ áreas micropapilares | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 |
| 5 | CIS em TM c/ áreas de microinvasão | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | Carcinoma papilar | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | CP com áreas tubulares | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | Carcinoma papilar | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 |
| 9 | Carcinoma papilar in situ | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 |
| 10 | TMB com áreas de carcinoma in situ | 3 | 2 | 6 | 3 | 2 | 6 |
| 11 | Carcinoma em tumor misto | 3 | 1 | 3 | 2 | 1 | 2 |
| 12 | Carcinoma papilar | 3 | 1 | 3 | 3 | 1 | 3 |
| 13 | CDIS em tumor misto | 3 | 2 | 6 | 3 | 1 | 3 |
| 14 | Carcinoma papilar | 3 | 2 | 6 | 3 | 2 | 6 |
| 15 | Carcinossarcoma c/ presença de emb.linf | 3 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 |

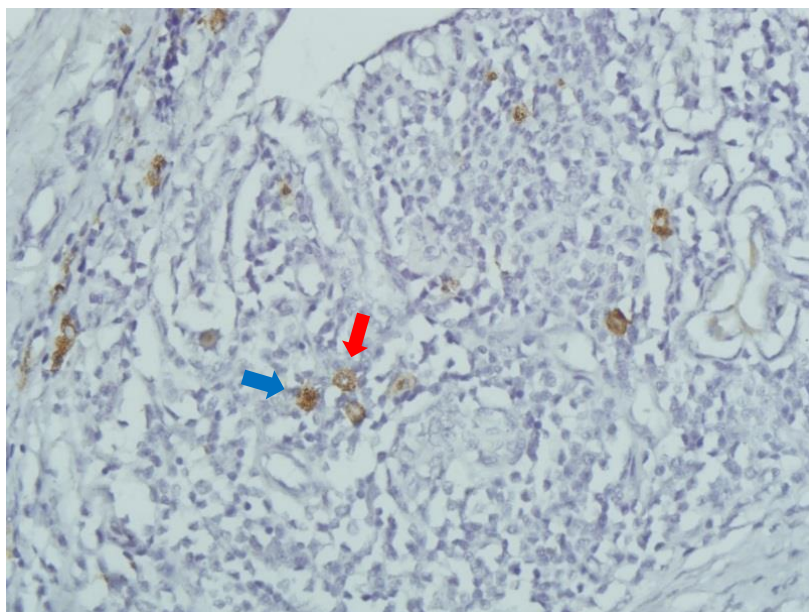


Figura 7. Carcinoma tubular com áreas micropapilares. Imunorreatividade para COX-2. Notar a marcação citoplasmática forte (coloração castanha) (seta vermelha) e nuclear (seta azul), de forma multifocal (40x).

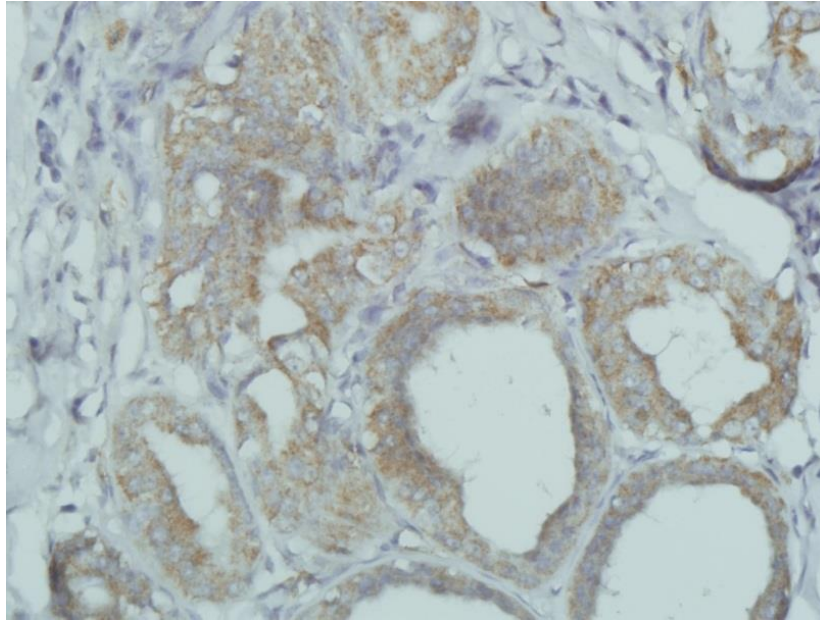


Figura 8. Carcinoma papilar. Imunorreatividade para COX-2. Notar marcação difusa em citoplasma de células epiteliais. (40x).

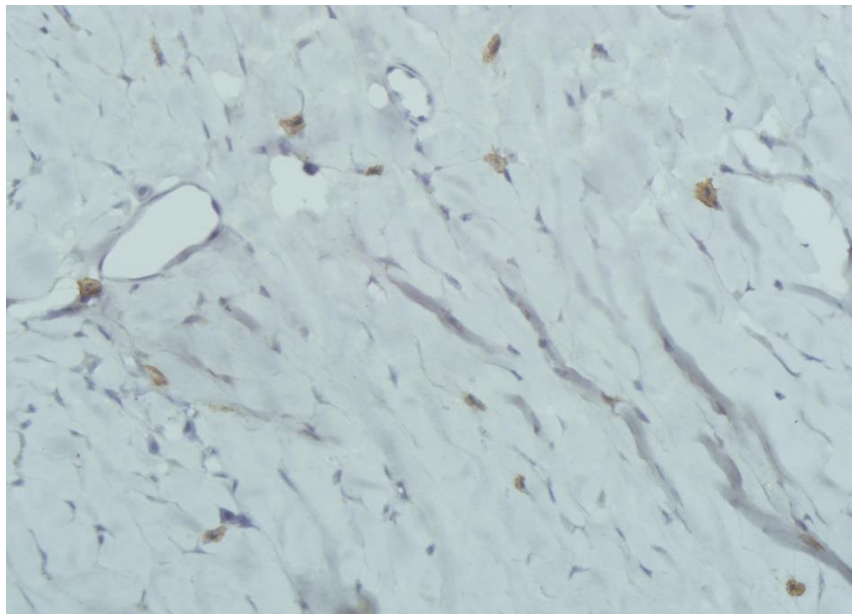


Figura 9. Carcinoma papilar. Imunorreatividade para COX-2. Notar marcação moderada em células mioepiteliais presentes no estroma. (40x).

No que diz respeito à expressão da COX-2, nas amostras do grupo 1, 78,9 % foram consideradas positivas, e nas amostras do grupo 2, 46,6% apresentaram a expressão. Considerando-se os critérios de agrupamento em

baixa imunorreatividade (0 a 5) e alta imunorreatividade (6 a 12), no grupo 1, 36,8 % das amostras foram agrupadas em baixa imunorreatividade e 63,1% alta reatividade. Nas amostras do grupo 2, 73,3% foram agrupadas em baixa imunorreatividade e 26,7% em alta reatividade.

Houve diferença significativa ($p=0,019$) da média dos escores de marcação da COX-2 entre o grupo tratado com firocoxibe e o grupo não tratado com firocoxibe, com maior expressão nas amostras do grupo 1 (figura 10).

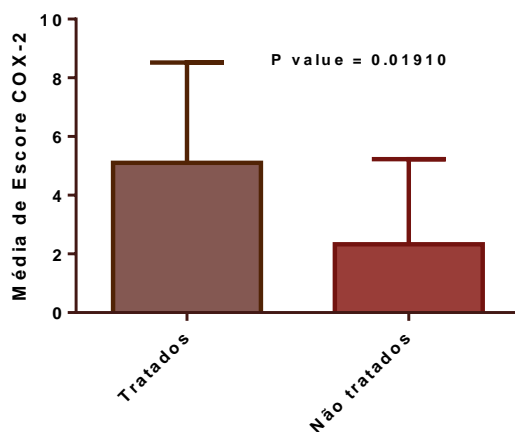


Figura 10. Média da expressão da COX-2 em neoplasias mamárias caninas, comparando-se os animais tratados (grupo 1) e não tratados com firocoxibe (grupo 2).

Com o intuito de verificar se, nos animais do grupo tratado firocoxibe, havia associação entre as variáveis resposta de redução do tumor (não redução/redução) e a imunorreatividade da COX-2 (baixa reatividade/alta reatividade) procedeu-se com o teste Exato de Fisher, não sendo evidenciada associação significativa entre estas variáveis ($p=0,60$) (figura 11).

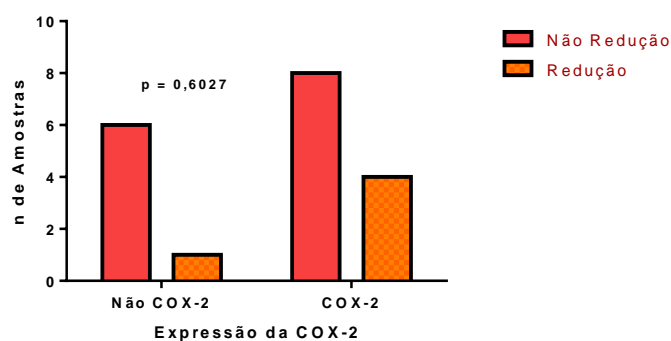


Figura 11. Relação entre a reatividade da COX-2 e a redução do diâmetro da neoplasia mamária canina, em pacientes do grupo 1, que fizeram uso do firocoxibe, por 30 dias.

Em nenhum dos grupos, foi observada associação significativa entre a média dos escores de COX-2 e a variável grupo histológico, grupo 1 ($p=0,1699$) e grupo 2 ($p=0,3778$); ou em relação a variável tamanho do tumor, grupo 1 ($p=0,7195$) e grupo 2 ($p=0,2641$).

5.4 EXPRESSÃO DO VEGF EM TUMORES MAMÁRIOS CANINOS

No que concerne ao VEGF, a imunorreatividade foi observada no citoplasma das células neoplásicas (figura 12 e 13), de forma focal e difusa. Alguns casos não apresentavam marcação de forma homogênea em todo o material histológico. Em tais casos, foi avaliada a marcação predominante.

A maioria das amostras pertencentes aos animais do grupo 1 (53%), apresentou imunorreatividade para a expressão dessa enzima. Nas amostras provenientes do Grupo 2, 74% foram consideradas positivas para a expressão do VEGF (tabela 3 e 4). Considerando-se os critérios de agrupamento em baixa imunorreatividade (0 a 5) e alta imunorreatividade (6 a 12), nas amostras do grupo 1, 57,89% foram agrupadas em baixa imunorreatividade e 42,1% em alta reatividade. Em relação as amostras do grupo 2, 80 % foram agrupadas em baixa imunorreatividade e 20% em alta imunorreatividade.

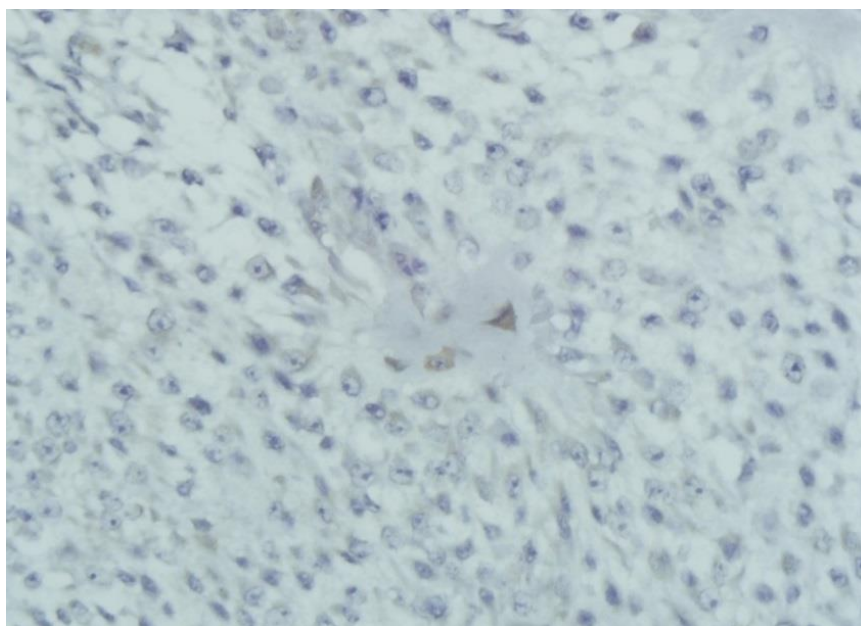


Figura 12. Carcinossarcoma. Baixa imunorreatividade para VEGF. Notar marcação citoplasmática fraca e de forma focal (40x).

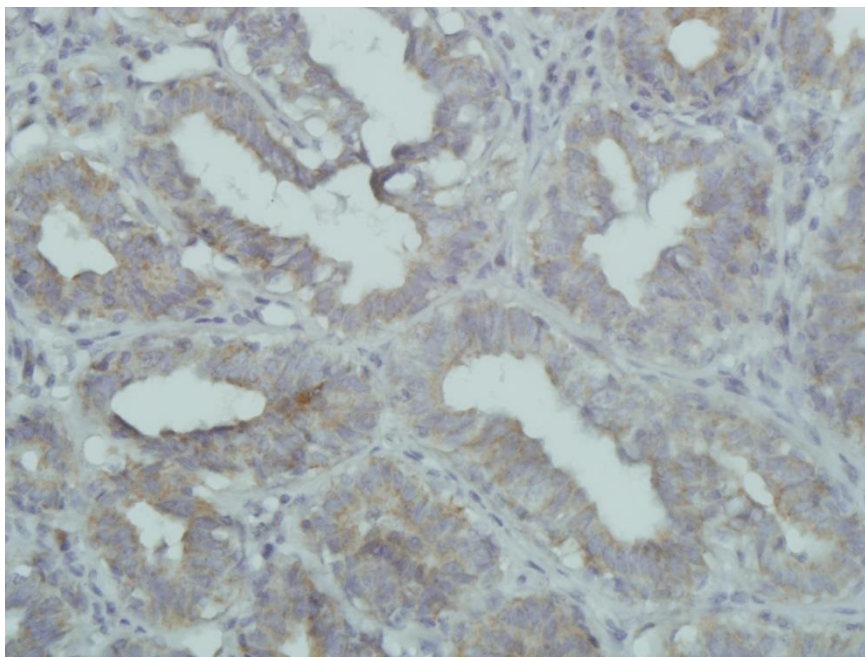


Figura 13. Carcinoma papilar invasor. Imunorreatividade para VEGF. Notar marcação citoplasmática moderada e difusa em células epiteliais (40x).

Não houve diferença significativa da média dos escores de marcação da VEGF entre o grupo tratado com firocoxibe e o grupo não tratado com firocoxibe ($p=0,69$) (figura 14). E também não houve associação entre a média dos escores de VEGF e a variável grupo histológico, ou a variável tamanho do tumor, seja no grupo 1 ou no grupo 2.

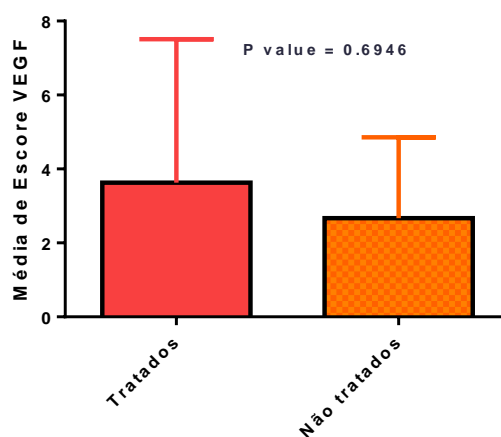


Figura 14. Média da expressão do VEGF em neoplasias mamárias caninas, comparando-se os animais tratados (grupo 1) e não tratados com firocoxibe (grupo 2).

5.5 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DA COX-2 E DO VEGF

Avaliando-se a correlação entre a imunorreatividade da COX-2 e do VEGF, observou-se correlação positiva entre estas variáveis, tanto para as amostras do grupo 1 quanto para àquelas do grupo 2 (Figura 15).

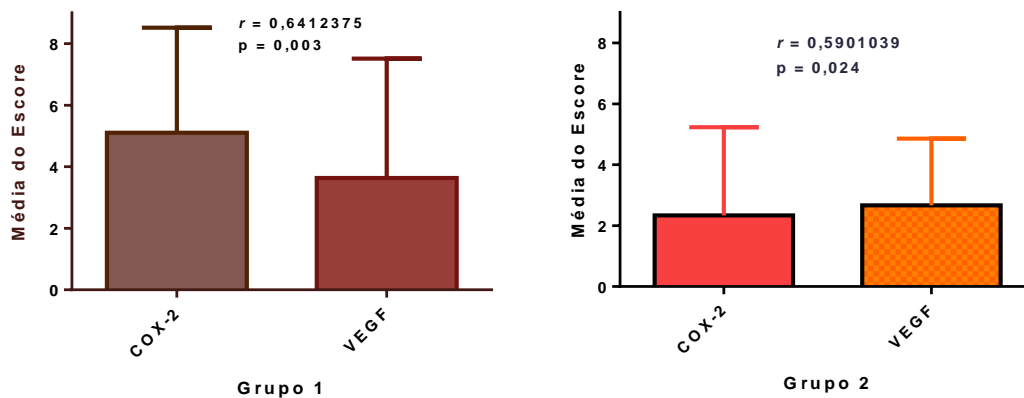


Figura 15. Análise de correlação entre a expressão da COX-2 e do VEGF, em neoplasias mamárias de cadelas tratadas com firocoxibe (grupo 1) e das cadelas não tratadas com firocoxibe (grupo 2).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, 96,96% (32/33) das amostras de neoplasia mamária foram classificadas como malignas. Esta ocorrência é superior às relatadas em outros estudos, que citam um índice de 50% (SLEECKX et al., 2011). Um dos fatores que poderiam estar associados a esta maior ocorrência é o tempo decorrido entre o aparecimento da lesão e o encaminhamento ao atendimento médico veterinário, que na maioria dos casos foi superior há oito meses. A média de idade dos animais foi de 9,5 anos.

Propõe-se que neoplasias mamárias caninas benignas sofram transformação em malignas, no decorrer do tempo (SORENMO et al., 2009). Dentre as argumentações apresentadas, os autores referem que neoplasias malignas possuem maior tamanho que as benignas, 4,7 vs 2,1 cm, e que os animais são mais idosos, 9,5 vs 8,5 anos.

Observamos neste estudo, tumores com diâmetros variáveis, com média de 4,78 cm. Mas, em diversas amostras de neoplasias malignas, os nódulos eram inferiores à 3 cm diâmetro. No único caso de neoplasia benigna, o tumor possuía diâmetro de 10 cm. De acordo com Ferrera et al. (2009), o tamanho da neoplasia pode ser considerado um fator prognóstico independente na neoplasia mamária em cadelas. Além disso, esses autores relatam que a maioria das lesões acima de cinco cm tende a ser malignas, apresentam alto índice de proliferação e maior agressividade quando comparadas às lesões menores.

A ocorrência das neoplasias foi maior em mamas abdominais e inguinais, corroborando com os dados descritos por Carvalho (2006), o qual afirma que 65% a 75% das neoplasias ocorre nas glândulas mamárias abdominal caudal e inguinal, provavelmente por possuírem maior volume de tecido glandular.

Com relação à imunoexpressão da COX-2, houve imunorreatividade deste marcador na maioria das amostras, entretanto, diversas amostras obtiveram marcação negativa ou baixa imunorreatividade, a despeito do predomínio de neoplasias malignas.

Os dados da literatura sobre o percentual de amostras de neoplasia mamária canina que expressam COX-2 são divergentes, variando de 54%

(DORÉ et al., 2003); 56% (HELLER et al., 2005); 76,2% (QUEIROGA et al., 2011); e 100% (MILLANTA et al., 2006; LAVALLE et al., 2009), em tumores malignos. Já para neoplasias benignas, o percentual relatado é de 7,1% (QUEIROGA et al., 2011) e 24% (DORÉ et al., 2003).

Neste estudo, a amostra de neoplasia benigna, classificada como tumor misto benigno, apresentou alta imunorreatividade para COX-2 (escore 8). Ainda que uma amostra não possibilite a análise comparativa com as neoplasias malignas, este índice foi superior à média dos escores das demais amostras.

No que concerne à associação entre a classificação histopatológica e a expressão da COX-2, como forma de viabilizar a análise, optou-se pela distribuição dos tipos histopatológicos em grupos, a saber Carcinoma in situ (CIS); Carcinoma simples (carcinoma tubular, carcinoma tubular, carcinoma túbulo-papilar); Carcinoma em tumor misto; e Carcinossarcoma. Não foi observada associação entre a expressão da COX-2 com os grupos histopatológicos, seja no grupo dos animais tratados com firocoxibe, seja no grupo dos não tratados. Resultado semelhante foi obtido por Ribeiro et al., (2009), os quais não observaram diferença da expressão da COX-2 comparando-se os grupos carcinoma evoluindo em tumor misto benigno (CATMB) e outros carcinomas (CA), sendo o último grupo constituído pelos subtipos tubular, papilar e sólido.

Alguns estudos evidenciaram maior expressão da COX-2 em neoplasias com classificações histopatológicas consideradas mais agressivas (LAVALLE et al., 2009; QUEIROGA et al., 2010). Um estudo desenvolvido por Heller et al. (2005) constatou que os carcinomas anaplásicos possuem maior expressão de COX-2, quando comparados aos adenocarcinomas.

Em relação à expressão do VEGF, os resultados foram similares àqueles encontrados para a COX-2, em relação ao percentual de expressão deste marcador nas amostras avaliadas, e a não evidência de associação com os tipos histopatológicos. Estes resultados estão de acordo com outros autores que relataram que a expressão do VEGF não demonstrou associação com o tipo histopatológico de neoplasias mamárias caninas (SANTOS et al., 2013).

Entretanto, divergem de Queiroga et al. (2011), que demonstraram haver associação significativa do VEGF com o tipo histopatológico do tumor ($p=0,005$). Os autores descreveram que maioria dos adenomas foi negativa

para a expressão do VEGF, enquanto que os tumores mistos benignos foram positivos para este marcador. E também dos dados obtidos por Restucci et al. (2002), que relataram haver diferença significativa de acordo com o tipo histopatológico do tumor.

As divergências encontradas entre os resultados podem estar relacionadas com as técnicas empregadas para avaliação da expressão tanto da COX-2 quanto do VEGF. A exemplo, no estudo desenvolvido por Restucci et al., (2002), para a avaliação da expressão do VEGF utilizou-se a contagem do número de células positivas entre 1000 células neoplásicas dentro de 20 campos selecionados. Já no nosso estudo, conforme descrição na metodologia, foi feita avaliação de toda a lâmina, não delimitando o número de campos e estimando o percentual de células marcadas presentes em cada campo de ampliação (20x).

Outro ponto a ser considerado é a diferença entre a distribuição das amostras de acordo com os tipos histopatológicos, que varia conforme os critérios de seleção e casuística de cada estudo. E também, deve-se pontuar que existem diferentes critérios adotados pelos autores para realizar as classificações histopatológicas das amostras. Estes fatores acarretam em dados que não possuem homogeneidade para comparação, o que salienta a importância de que sejam adotados critérios para a padronização das informações acerca das neoplasias mamárias caninas (CASSALI, Geovanni D. et al., 2011)

No que diz respeito à correlação entre enzimas COX-2 e VEGF, neste estudo observou-se correlação positiva entre esses marcadores, tanto nas amostras do grupo tratado como nas amostras do grupo não tratado com firocoxibe. De acordo com Queiroga et al. (2012), mediante a expressão da COX-2, ocorre um estímulo das metaloproteinases, aumentando assim a capacidade de invasão devido a ativação do gene bcl-2. Essa ativação faz com haja a liberação de vários fatores angiogênicos, inclusive o VEGF.

Resultados semelhantes foram descritos por outros autores que também demonstraram correlação positiva entre a expressão de COX-2 e de VEGF, em neoplasia mamária canina (MILLANTA et al., 2006; QUEIROGA et al., 2011). Queiroga et al. (2001) observaram que existe correlação positiva entre a expressão da COX-2 e VEGF em tumores mamários malignos. Em seu estudo,

das 31 amostras neoplásicas que expressaram COX-2, 31 também foram positivas com relação ao VEGF ($p=0,008$).

Tendo em vista o potencial terapêutico relacionado ao uso dos inibidores da COX-2 em casos neoplásicos, no presente estudo foram avaliados os efeitos decorrentes do uso de um inibidor seletivo de COX-2, firocoxibe, durante 30 dias, em cadelas portadoras de neoplasia mamária canina. Após o término do tratamento, foi constatada redução do diâmetro tumoral, em 28,57% dos casos, embora não tenha sido detectada variação significativa desta redução.

Nas condições deste experimento, o uso do firocoxibe não acarretou em sinais de toxicidade, seja pelos exames clínicos, hematológicos ou bioquímicos. Os resultados de ureia, creatinina, ALT e AST obtidos neste trabalho, de forma geral, encontram-se dentro dos valores referenciais para a espécie. As pequenas variações observadas nos valores de ureia estão mais associadas às alterações individuais do que aos efeitos colaterais do firocoxibe, haja vista que a maioria precedia o uso do medicamento, e que não houve a elevação concomitante dos níveis de creatina séricos.

Tais achados são condizentes com os relatos de que a administração oral de 5,3 mg/kg de firocoxibe, durante 29 dias para cães saudáveis, não acarretou em alterações no hemograma, bioquímica sérica, agregação plaquetária, tempo de coagulação e também não promoveu aparecimento de lesões gástricas ou sangue oculto fecal nestes animais (STEAGALL et al., 2007a).

Embora tenha havido evidências clínicas da resposta ao uso do firocoxibe, um resultado que deve ser destacado no presente estudo é o fato de que houve diferença significativa ($p=0,019$) da média dos escores de expressão da COX-2 entre o grupo tratado com firocoxibe (grupo 1) e o grupo não tratado com firocoxibe (grupo 2), com maior expressão nas amostras do grupo 1. Este resultado foi ratificado pelo fato de não ter havido associação significativa entre a redução dos tumores e a expressão da COX-2 nestas amostras.

Não há estudos prévios que tenham utilizado a mesma metodologia que a do presente trabalho, para que seja tecida a comparação dos dados. Um estudo similar, foi realizado em sete cadelas diagnosticadas com carcinoma

inflamatório, e que fizeram uso do inibidor da COX-2, piroxicam. Os animais tratados apresentaram melhora da resposta clínica da neoplasia, com diminuição do eritema, edema e dor, e também demonstraram aumento da sobrevida, em comparação ao grupo tratado com doxorrubicina. Apesar desta resposta, 65,72% das amostras neoplásicas apresentaram imunorreatividade para a expressão da COX-2, após o uso do piroxicam (SOUZA et al., 2009).

Lavalle et al. (2012) desenvolveram estudo avaliando a sobrevida de cadelas portadoras de neoplasias mamárias, submetidas a quatro protocolos de tratamento: (G1) excisão cirúrgica; (G2) excisão cirúrgica + carboplatina; (G3) excisão cirúrgica + carboplatina + piroxicam; e (G4) excisão cirúrgica + carboplatina + firocoxibe. Os grupos que receberam carboplatina, associada ou não aos AINES, apresentaram taxa de sobrevida maior quando comparada aos animais que só passaram pelo procedimento cirúrgico, não havendo diferença significativa de sobrevida entre os três grupos.

Os resultados obtidos por este estudo corroboram com a argumentação que ainda não há evidências suficientes de que a expressão da COX-2 possa ser útil para prever sobre a resposta da neoplasia ao uso de inibidores da COX-2. Uma hipótese a ser considerada é a de que a expressão da COX-2, detectada pelo método de imuno-histoquímica, pode não refletir a real atividade enzimática da COX-2, e os consequentes níveis de PGE2 tumorais (DORÉ, 2011).

A despeito deste fato, a melhora clínica observada nos animais reforça a indicação do uso de inibidores da COX-2, como terapia preventiva ou adjuvante, em casos neoplasias mamárias caninas (CASSALI, Geovanni D. et al., 2011; DE NARDI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012; XU et al., 2014). Faz-se necessária a realização de estudos envolvendo um maior número de animais, para que haja melhor compreensão dos eventos observados no presente estudo, bem como para a investigação de marcadores que possuam melhor eficiência para prever sobre a resposta à terapia com inibidores da COX-2.

7. CONCLUSÃO

As neoplasias mamárias caninas tem sido alvo de estudo de diversos pesquisadores devido as suas peculiares características clínicas e biológicas.

As avaliações desenvolvidas no presente trabalho tiveram como objetivo aprofundar o conhecimento acerca de fatores clinicopatológicos que influenciam no comportamento biológico dessas neoplasias.

Estudos descritos em medicina humana e veterinária relatam que a COX-2 é expressa em diversos tipos de neoplasias, sobretudo em neoplasias mamárias. Em nosso estudo pudemos perceber que houve uma variedade com relação ao tipo histológico das neoplasias e através da técnica de Imunohistoquímica, revelou-se que a maioria dos tipos histológicos apresentou expressão para a COX-2 e o VEGF, sugerindo que as enzimas analisadas podem exercer influência sobre a patogenia desse tipo de neoplasia.

Foi demonstrada uma associação entre os dois marcadores, dessa forma, estudos são necessários para confirmar o papel da expressão combinada das duas enzimas como um fator prognóstico.

Na medicina veterinária, muitos estudos sugerem a utilização de AINEs como terapia adjuvante para o tratamento da neoplasia mamária. No entanto, não há estudos clínicos que comprovem essa eficácia. Tendo em vista que nosso estudo foi o primeiro a fazer uso do firocoxibe como terapia prévia à indicação cirúrgica, nossos resultados possibilitaram avaliar o efeito desse medicamento sobre a neoplasia.

Com base em nossos resultados podemos admitir que o uso do firocoxibe mostrou-se eficaz, tendo em vista que se observou redução macroscópica do tumor em 28,5% dos animais avaliados, apesar de não ter havido diferença estatística.

No entanto, no que se refere à expressão da COX-2 nas neoplasias, demonstrou-se que o uso do firocoxibe não reduziu a expressão dessa enzima nas amostras analisadas. A determinação dos níveis de COX-2 na neoplasia pode não ser um bom indicador para a resposta ao tratamento com AINEs. Dessa forma, sugere-se que novos estudos sejam desenvolvidos a fim de se

avaliar a eficácia dos inibidores da COX-2 no tratamento das neoplasias mamárias caninas.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, T. B. D. **NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS: CARACTERIZAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE ESTRESSE (HSP 72)**. 2006. 49 (MESTRADO). UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CASSALI, G. D. et al. Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, v. 4, n. 2, p. 153-180, 2011.

CIRILLO, J. V. Tratamento quimioterápico das neoplasias mamárias em cadelas e gatas. **Inst Ciênc Saúde**, v. 26 (3), p. 3, 2008.

CLEMENTE, M. et al. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. **Vet J**, v. 11, n. 13, p. 00071-3, 2013.

DE NARDI, A. B. et al. COX-2 Inhibitors for Cancer Treatment in Dogs. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 31, n. 4, p. 275-279, 2011.

DE NARDI, A. B. et al. PREVALÊNCIA DE NEOPLASIAS E MODALIDADES DE TRATAMENTOS EM CÃES, ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ **Archives of Veterinary Science** v. 7, p. 15-26, 2002.

DORÉ, M. Cyclooxygenase-2 Expression in Animal Cancers. **Veterinary Pathology Online**, v. 48, n. 1, p. 254-265, January 1, 2011 2011. Disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/48/1/254.abstract> >.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. Cyclooxygenase-2 Expression in Canine Mammary Tumors. **Veterinary Pathology Online**, v. 40, n. 2, p. 207-212, March 1, 2003 2003. Disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/40/2/207.abstract> >.

FERREIRA, E. et al. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 7, p. 230-235, 2009.

FERREIRA, M. et al. Prolactin receptor expression in gynaecomastia and male breast carcinoma. **Histopathology** v. 53, p. 56-61, 2008.

FERRI, S. T. S. Tumores mamários em fêmeas caninas e felinas: revisão de literatura. **A Hora Veterinária**, v. 22, p. 64-67, 2003.

FILGUEIRA, K. D. **Características anatomopatológicas de neoplasias mamárias em cadelas criadas no município de Fortaleza-CE**. 2003. 85 (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará

FONSECA, C. S.; DALECK, C. R. Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovariectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural**, v. 30, p. 731-735, 2000. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782000000400030&nrm=iso >.

GAMA, A. et al. Expression of E-cadherin, P-cadherin and β -catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **The Veterinary Journal**, v. 177, n. 1, p. 45-53, 2008. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307002006> >.

GONÇALVES, D. G. **LEVANTAMENTO DE CASOS DE NEOPLASIA MAMÁRIA EM FELINOS, DIAGNOSTICADOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE (CAMPUS DE PATOS - PB), NO PERÍODO DE 2003-2007**. 2008. 35 (MONOGRAFIA). UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

GraphPad Prism version 6.00 for Windows. La Jolla California USA: GraphPad Software.

GUIMARÃES, M. J. et al. Concurrent Expression of Cyclo-oxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Canine Malignant Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 1, p. 27-34, 2014. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997513001151> >.

GUIMARÃES, M. J. C., M. I.; PIRES, I.; PRADA, J.; GONZALEZ GIL, A.; LOPES, C.; QUEIROGA, F. L. . Concurrent Expression of Cyclo-oxygenase-2 and Epidermal Growth Factor Receptor in Canine Malignant Mammary Tumours. . **Journal of Comparative Pathology**, p. 1-8, 2013.

GUIMARÃES, M. J. G. **PESQUISA DA INTERAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DO EGFR E DA COX-2 NOS TUMORES DE MAMA DA CADELA**. 2012. 83

(MESTRADO). Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade do Porto - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Alazar

HELLER, D. A. et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Vet Pathol**, v. 42, n. 6, p. 776-80, Nov 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16301573> >.

KANAOKA, S.; TAKAI, T.; YOSHIDA, K. Cyclooxygenase-2 and tumor biology. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 43, p. 59-78, 2007.

LAVALLE, G. E. et al. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. **Veterinary Pathology Online**, v. 46, n. 6, p. 1275-1280, November 1, 2009 2009. Disponível em: <http://vet.sagepub.com/content/46/6/1275.abstract> >.

LAVALLE, G. E. et al. Canine Malignant Mammary Gland Neoplasms with Advanced Clinical Staging Treated with Carboplatin and Cyclooxygenase Inhibitors. **In Vivo**, v. 26, n. 3, p. 375-379, May 1, 2012 2012. Disponível em: <http://iv.iarjournals.org/content/26/3/375.abstract> >.

MICHEL, E. F., STEFANIE K; KOWALEWSKI, MARIUSZ P; BLEY, CARLA ROHRER; BOOS, ALOIS ; GUSCETTI, FRANCO; REICHLER, IRIS M Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. **Veterinary Research** v. 8, p. 8, 2012.

MILLANTA, F. et al. Comparison of steroid receptor expression in normal, dysplastic, and neoplastic canine and feline mammary tissues. . **Res Vet Sci**, v. 79, p. 225–232., 2005.

MILLANTA, F. et al. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006/07/01 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-005-9138-z> >.

MOHAMMED, S. I. et al. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 70, n. 5, p. 479-483, 2004. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952327803002369> >.

OLIVEIRA FILHO, J. C. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p. 177-185, 2010. Disponível

em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2010000200014&nrm=iso >.

OLIVEIRA, L. O. O., R.T; LORETTI, A. P; RODRIGUES, R; DRIEMEIER, D. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE**, v. 31, p. 105-110, 2003a.

_____. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA NEOPLASIA MAMÁRIA CANINA. **ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE**, v. 31 (2), p. 6, 2003b.

PEREZ ALENZA, M. D. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumours. **J Small Anim Pract** v. 41, p. 287–291, 2000.

QUARESMA, A. M. G. G. **Canine mammary tumours: new insights into prognosis and molecular classification**. 2008. 210 (DOUTORADO). Departamento de Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

QUEIROGA, F. L. **Tumores Mamários da Cadela. Estudo de Factores Biológicos (Ciclooxigenases 1 e 2; Prolactina; Hormona do Crescimento; Factor I de Crescimento Tipo Insulina) e da sua Implicação Clínica e Prognóstica**. 2005. 204 (DOUTORADO). Departamento de Ciências Veterinárias, UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

QUEIROGA, F. L. et al. Expression of Cox-1 and Cox-2 in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 136, n. 2–3, p. 177-185, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997507000199> >. Acesso em 2007/4//.

QUEIROGA, F. L., CARLOS. Tumores mamários caninos, pesquisa de novos factores de prognóstico. **REVISTA PORTUGUESA DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**, v. 97, p. 9, 2002.

QUEIROGA, F. L. et al. Positive correlation of steroid hormones and EGF in canine mammary cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 115, n. 1–2, p. 9-13, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076009000533> >.

QUEIROGA, F. L. et al. Role of steroid hormones and prolactin in canine mammary cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 94, n. 1–3, p. 181-187, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076004004431> >.

QUEIROGA, F. L. et al. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 441-445, 6// 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528809002550> >.

QUEIROGA, F. L. et al. COX-2 over-expression correlates with VEGF and tumour angiogenesis in canine mammary cancer. **The Veterinary Journal**, v. 189, n. 1, p. 77-82, 2011.

RAICA, M.; CIMPEAN, A. M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 11, p. 1924-1934, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804909002524> >.

RIVERA, P. et al. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research** v. 69 p. 8770–8774, 2009.

SANTOS, A. et al. Identification of prognostic factors in canine mammary malignant tumours: a multivariable survival study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2013. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/9/1> >.

SANTOS, A. A. F. et al. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 4, p. 268-275, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997510000745> >.

SILVA, J. R. S. D. **MASTECTOMIA EM CADELAS - VARIAÇÕES DA TÉCNICA SEGUNDO A DRENAGEM LINFÁTICA DA CADEIA MAMÁRIA - REVISÃO DE LITERATURA**. 2006. 45 (ESPECIALIZAÇÃO). UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO

SLEECKX, N. et al. Canine Mammary Tumours, an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 6, p. 1112-1131, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x> >.

SLEECKX, N. et al. Evaluation of Immunohistochemical Markers of Lymphatic and Blood Vessels in Canine Mammary Tumours. **J Comp Pathol**, v. 1, n. 12, p. 00163-6, 2013.

SLEECKX, N. et al. Angiogenesis in Canine Mammary Tumours: A Morphometric and Prognostic Study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 150, n. 2–3, p. 175-183, 2013. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002199751300159X> >. Acesso em 2014/4//.

SORENMO, K. U. et al. Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Vet Comp Oncol**, v. 7, n. 3, p. 162-72, Sep 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19691645> >.

SOUZA, M. C. H. et al. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: Clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Can Vet J**, v. 50, n. 5, p. 506-10, 2009.

STEAGALL, P. V. M. et al. Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 218-223, 2007a. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00842.x> >.

STEAGALL, P. V. M. et al. Evaluation of the adverse effects of oral firocoxib in healthy dogs. **JOURNAL VETERINARY PHARMACLOGY THERAPY**, v. 30, p. 6, 2007b.

THURÓCZY, J. et al. Immunohistochemical Detection of Progesterone and Cellular Proliferation in Canine Mammary Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 137, n. 2-3, p. 122-129, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997507000898> >. Acesso em 2007/10//.

TSOLI, E. et al. Growth Index Is Independent of Microvessel Density in Non-Small-Cell Lung Carcinomas. **HUMAN PATHOLOGY** v. 33, p. 7, 2002.

TUOHY, J. L. et al. A review of sentinel lymphnode evaluation and the need for its incorporation into veterinary oncology. **Vet Comp Oncol**, v. 7, p. 81-91, 2009.

XU, L. et al. COX-2 Inhibition Potentiates Antiangiogenic Cancer Therapy and Prevents Metastasis in Preclinical Models. **Science Translational Medicine**, v. 6, n. 242, p. 242ra84, June 25, 2014 2014. Disponível em: <http://stm.sciencemag.org/content/6/242/242ra84.abstract> >.

ZUCCARI, D. A. P. C. **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas.** . 2001. 92 Tese de Doutorado em Clínica Médica Veterinária (Doutorado). UNESP - "Júlio de Mesquita Filho" -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

ZUCCARI, D. A. P. C.; SANTANA, A. E.; ROCHA, N. S. Fisiopatologia da neoplasia mamária em cadelas–revisão. **Clinica Veterinária**, v. 32, p. 50-54, 2001.

ANEXO I

Protocolo da técnica de Imuno-histoquímica desenvolvida através do método LSAB.

Método LSAB

1º DIA

. Desparafinização

| Solução | Tempo | Temperatura |
|-----------------|---------|-------------|
| Xilol I | 15 min. | ambiente |
| Xilol II | 15 min. | ambiente |
| Xilol+Álcool | 10 min. | ambiente |
| Alcool Absoluto | 05 min. | ambiente |
| Álcool Absoluto | 05 min. | ambiente |
| Álcool 95% | 05 min. | ambiente |
| Álcool 70% | 05 min. | ambiente |
| PBS | 05 min. | ambiente |

- Fazer o bloqueio da peroxidase em solução de H₂O₂ diluído em metanol, durante 1h (20ml H₂O₂ 30% + 80 ml de água destilada)
- Desmascaramento em Tampão Citrato 1X (pH 6,0)(**quando o material for fixado em formol**), durante 20 minutos no forno microondas.
- 3 lavagens em PBS 1X (500µl de tween 20), por 5 minutos cada.
- Bloqueio de reações inespecíficas com solução de leite desnatado 3%, diluído em PBS 1X, durante 30 minutos (temperatura ambiente)
- Incubação das lâminas com o Anticorpo primário diluído em PBS) 1X (1:100, variando para cada tipo de anticorpo) overnight, em câmara úmida. Utilizar 100-200µL/lâmina.

VEGF Clone VG1 (DAKO) Ref. M7273 - 1: 100

COX 2 – (Dako) 1:100

2º dia

- 3 lavagens em PBS 1X (500µl de tween 20), por 5 minutos cada.

- Incubação com Anticorpo secundário Biotinilado (amarelo), durante 45 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente.
- 3 lavagens em PBS 1X (500µl de tween 20), por 5 minutos cada.
- Incubação com o complexo Estreptavidina-Peroxidase (vermelho), durante 45 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente.
- 3 lavagens em PBS 1X (500µl de tween 20), por 5 minutos cada.
- Revelação com Diaminobenzidina (1 gota DAB + 1ml diluente), observando a coloração. Utilizar 100 µL/lâminas e fazê-las individualmente.
- 3 lavagens em PBS 1X (500µl de tween 20), por 5 minutos cada.
- Contra coloração com Hematoxilina por 3 min. (verificar a hematoxilina) e lavagem em água corrente .
- Colocar água amoniacal (0,5%) rapidamente e lavar em água corrente por 5 minutos.
- Diafanização

| Solução | Tempo | Temperatura |
|-----------------|--------------|--------------------|
| Álcool 70% | 5 min. | Ambiente |
| Álcool 95% | 5 min. | Ambiente |
| Álcool Absoluto | 5 min. | Ambiente |
| Alcool Absoluto | 5 min. | ambiente |
| Xilol+Álcool | 10 min. | ambiente |
| Xilol I | 10 min. | ambiente |
| Xilol II | 10 min. | ambiente |

- montagem com lamínula e permount

Receita **Tampão Citrato**

Solução 10X

- **Citrato de Sódio** (Synth) - 29.4g

Diluir em 1 Litro de água destilada

PH 6,0

- **Ácido Cítrico** - 21,014g
Diluir em 1 litro de PBS

Conservar na geladeira as duas soluções.

Quando for usar para fazer o desmascaramento em Tampão Citrato:

Pegar 80ml da Solução Citrato de Sódio e 20ml da Solução Ácido Cítrico e completar para 1 litro com água destilada.

Receita **PBS 10X**

Solução : (Deixar na geladeira)

Fosfato de Sódio Bibásico Anidro (Synth) - 10,61g

Sódio fosfato monobásico monidrato (Merck) - 3,89g

Cloreto de Sódio (Synth) – 8,5g

Água destilada – 1 litro

PH 7,0

Quando for usar: Pegar 100ml da solução e completar com água destilada para 1 litro.

Receita: **Tris/Edta** – Para um 1 litro

1,21g – Tris

0,37g - Edta