

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA
DE TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS SUBMETIDAS
A TRATAMENTO COM INIBIDOR DA CICLOXIGENASE-2 (Firocoxibe)**

FLAVIO ELSTON

**Botucatu-SP
Dezembro, 2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA
DE TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS SUBMETIDAS
A TRATAMENTO COM INIBIDOR DA CICLOXIGENASE-2 (Firocoxibe)**

FLAVIO ELSTON

**Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, da Universidade Estadual
paulista, UNESP, Campus de
Botucatu, para a obtenção do título
de Mestre em Medicina Veterinária,
área de concentração clínica
veterinária, linha de pesquisa
afecções clínicas de cães e gatos e
área de conhecimento clínica
veterinária**

**Orientador: Prof. Ass. Dr. Luiz
Henrique de Araujo Machado**

Botucatu-SP

Dezembro, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Elston, Flavio.

Avaliação clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em
cadela submetidas a tratamento com inibidor da ciclooxigenase-2
(firocoxibe) / Flavio Elston. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Capes: 50501062

Cão – Doenças. 2. Mamas - Câncer. 3. Oncologia veterinária. 4.
Agentes antiinflamatórios.

Palavras-chave: Cães; Ciclooxigenase; Mama; Oncologia.

Nome do autor: Flavio Elston

Título: AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOISTOQUÍMICA DE TUMORES MAMÁRIOS EM CADELAS SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM INIBIDOR DA CICLOXIGENASE-2 (FIROCOXIBE)

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo. Machado

Presidente e orientador

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Profa. Ass. Dra. Maria Lucia Gomes Lourenço

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Adjunto Moacir Leomil Neto

Membro

Curso de Medicina Veterinária

PUC Minas Campus Poços de Caldas

Data da defesa: 17 de dezembro de 2012

A todos os meus muitos animais, que se fosse listar não caberiam aqui, os quais me ensinaram a beleza do olhar, a sorrir e a demonstrar afeto em silêncio. Principalmente ao Barão, que teimosamente me acompanha há 36 anos.

A todos os meus amigos e parentes que, com persistência inabalável durante anos e anos, conseguiram me convencer a iniciar e concluir o mestrado. Vocês são responsáveis por isto.

Agradeço

Ao meu orientador, amigo, e colega de profissão, pela paciência, e apoio durante esta caminhada.

Ao meu amor, que me ampara, acolhe e auxilia. Atenta, sempre ao meu lado, independente do meu humor. Lilian você será minha professora da vida inteira. Obrigado

Aos meus filhos, pelo apoio e paciência.

Aos demais membros da banca examinadora, Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Gomes Lourenço, Prof. Dr. Moacir Leomil Neto e Prof^a. Dr^a. Patrícia Popak Lucaks por aceitaram prontamente o convite.

Ao São Totonho, por me receber em sua casa e oficina, junto à sua família maravilhosa; Bió, Ana, Maria e Helena fizeram as longas viagens ficarem bem mais curtas.

À Prof^a Dr^a Fabíola Soares Zahn, pela grande ajuda no momento final da dissertação. Acredito que não deva renegar seu talento.

Ao Guilherme Soares Zahn e ao Matheus Sudano, pelas análises estatísticas.

À Prof^a Dr^a Renée Laufer Amorim e à Prof^a Dr^a Noeme Sousa Rocha, pelo direcionamento inicial deste trabalho.

À colega Anaiara Peixoto, pelo auxílio na triagem, nas anestésias e no acompanhamento pós-operatório dos animais, tendo sempre um sorriso no rosto, independente do que estivesse acontecendo.

Aos meus alunos, agora colegas, Pamela, Jesana, Mariane e Luiz Vicente, pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos.

Ao Prof. Dr. Geovanni Cassali pelo auxílio no diagnóstico e classificação das lâminas histopatológicas.

À Prof^a. Dr^a Lilian Barreto Elston, pela leitura das lâminas histológicas e de imunoistoquímica.

À professora e amiga Malê, por estar sempre pronta a auxiliar e aconselhar, principalmente nos momentos de “bloqueio”.

Aos Colegas do Curso de Medicina Veterinária da PUC Minas Poços de Caldas, pelo apoio e incentivo permanentes.

Aos funcionários e técnicos do Curso de Medicina Veterinária da PUC Minas Poços de Caldas, principalmente Wander e Walquiria, por estarem sempre à disposição.

À colega de mestrado Amanda, também orientada do Prof. Dr. Luiz Henrique, pela colaboração nos trabalhos.

Ao Carlos Eduardo pelo auxílio no processamento das lâminas de imunoistoquímica.

Ao Laboratório Merial, na pessoa do Leonardo Brandão, pelo fornecimento do medicamento e material laboratorial para realização deste trabalho.

À Sociedade Mineira de Cultura, pela cessão das instalações e possibilidade de adaptação de meu horário de trabalho às necessidades do curso de mestrado. Sem a grande compreensão e colaboração do Prof. Dr. Domingos Marcelo Cenachi Pesce, este trabalho não se realizaria.

A Ele, por permitir que estejamos vivos e convivendo com pessoas queridas.

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Número de nódulos mamários nas cadelas estudadas.	26
TABELA 2 - Distribuição anatômica dos nódulos mamários nas cadelas estudadas.	26
TABELA 3 - Dados dos parâmetros idade, número de nódulos (No. NOD), classificação do tumor (CLASS), volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e valores séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT, proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas no grupo controle nos dois momentos experimentais (D0 e D7).	28
TABELA 4 - Dados dos parâmetros idade, número de nódulos (No. NOD), classificação do tumor (CLASS), volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e valores séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT, proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas no grupo tratado nos dois momentos experimentais (D0 e D7).	29
TABELA 5. Médias e desvio padrão (DP) dos parâmetros volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e níveis séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT e proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas nos grupos controle e tratado nos dois momentos experimentais (D0 e D7).	30

Lista de Quadros

QUADRO 1 - EDK adaptada para caninos (Valadão, 2007).	20
QUADRO 2 - Estadiamento clínico (TNM) de carcinomas mamários segundo Owen (1980).	21
QUADRO 3 - Recomendação do protocolo cirúrgico conforme Daleck et al. (1998).	28

Lista de Figuras

- FIGURA 1 - Representação gráfica da proporção média de tumores malignos de acordo com o tamanho do maior nódulo. 31
- FIGURA 2 - Representação gráfica da comparação entre as proporções médias de cada tipo de tumor nos dois momentos de avaliação. 32

Lista de Abreviações

COX – Cicloxigenase

EDK - Escala de Desempenho de Karnofsky

AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais

SID – uma vez ao dia

IV – intravenoso

AST – Aspartato transaminase

ALT – Alanina transaminase

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DA LITERATURA	6
Aspectos epidemiológicos do tumor de mama.....	6
Aspectos biológicos dos tumores de mama	7
Aspectos clínicos dos tumores de mama	8
Diagnóstico.....	10
Tratamento dos tumores de mama em cadelas	11
Cicloxigenases.....	12
Neoplasias X Cicloxigenases	14
Inibidores das cicloxigenases.....	15
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
Local	18
Animais	18
Avaliação clínica	19
Grupos	20
Estadiamento clínico	21
Protocolo anestésico	22
Protocolo cirúrgico	22
Processamento das amostras	23
Imunoistoquímica.....	23
Classificação das amostras	24
Análises laboratoriais	25
Análise Estatística.....	25
RESULTADOS	26
DISCUSSÃO	33
CONCLUSÕES.....	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41
ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL.....	47

RESUMO

ELSTON, F. **Avaliação clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em cadelas submetidas a tratamento com inibidor da cicloxigenase-2 (firocoxibe)**. Botucatu, 2012. 57p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Tumores mamários expressam a enzima cicloxigenase (Cox-2), que caracteriza um processo inflamatório intenso e pode também demonstrar a presença de alterações paraneoplásicas. Este trabalho teve por objetivo estudar a expressão de Cox-2 em tumores mamários de cadelas e avaliar o efeito do anti-inflamatório firocoxibe sobre a mesma. Os animais selecionados foram divididos em dois grupos: controle (9 animais) e tratado (10 animais). As cadelas foram avaliadas por exame clínico, bioquímica sérica, tamanho, volume, localização e avaliação TNM dos tumores e avaliação da qualidade de vida. O grupo tratado recebeu o firocoxibe na dosagem de 5mg/kg ao dia por sete dias e após este período todos os animais foram novamente avaliados e submetidos à mastectomia. As amostras obtidas nos dois momentos foram avaliadas por exame histológico e imunoistoquímica para expressão de Cox-2. Os resultados mostraram que, embora não tenha havido diferença no tamanho do maior nódulo ou na expressão de COX -2 entre os grupos após o tratamento, o aumento na expressão de COX-2 observado no grupo controle não foi verificado no grupo tratado e que os animais que receberam o tratamento por 7 dias apresentaram diminuição dos níveis de proteínas séricas totais ($p=0.00588$) e aumento dos níveis séricos de uréia ($p=0.01388$). Estes resultados sugerem que o uso do firocoxibe como coadjuvante no tratamento de cadelas com neoplasia mamária submetidas à mastectomia pode ser benéfico para deter a evolução da doença, embora seja indicado o acompanhamento dos animais para garantir que não haja sangramento gastrointestinal e que a saúde seja preservada.

Palavras chave: Oncologia, mama, firocoxibe, cães.

ABSTRACT

ELSTON, F. Clinical and immunohistochemical evaluation of mammary tumors in female dogs undergoing treatment with inhibitors of cyclooxygenase-2 (firocoxib). Botucatu, 2012. 57p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Breast tumors express the enzyme cyclooxygenase (COX-2), characterizing an inflammatory process and also demonstrate the presence of paraneoplastic alterations. This experiment aimed to study the expression of Cox-2 in mammary tumors of dogs and to evaluate the effect of anti-inflammatory firocoxib on it. The selected animals were divided into two groups: control (9 animals) and treated (10 animals). The animals were evaluated by clinical examination, serum biochemistry, size, volume, location and TNM evaluation of tumors and assessment of quality of life. The treatment group received firocoxib at dosage of 5mg/kg daily for seven days and after this period all animals were re-evaluated and submitted to mastectomy. The samples obtained at both moments were evaluated by histology and immunohistochemistry for the expression of Cox-2. The results showed that, although there was no difference in size of the largest tumor or in the expression of COX-2 between the groups after treatment, increased expression of COX-2 seen in the control group was not observed in the treated group and that those animals that received firocoxib for 7 days showed decreased levels of total serum protein ($p = 0.00588$) and increased serum levels of urea ($p = 0.01388$). These results suggest that the use of firocoxib as adjuvant therapy for dogs with breast cancer submitted to mastectomy can be beneficial to halt the progression of the disease, although monitoring of animals is indicated to ensure there is no gastrointestinal bleeding and health is preserved.

Keywords: Oncology, breast, firocoxib, dogs.

INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são as mais comuns das neoplasias caninas (WITHROW, 2007; MORRIS, 2010) totalizando cerca da metade dos tumores diagnosticados em cadelas. São raros em animais jovens, acometendo animais com idade média entre nove e 11 anos (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002; GALERA *et al.*, 2002; MORRISON, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Por sua vez, o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres e representa aproximadamente 15% do total de mortes por câncer na espécie humana no Brasil (CASSALI, 2000). Segundo o Ministério da Saúde, 50,7% de todas as neoplasias femininas causadoras de óbito são carcinomas de mama (1º Lugar), seguido pelo câncer de colo de útero 19,2% do total dos novos casos de câncer em mulheres no Brasil. A mortalidade pelo câncer de mama compreende cerca de 2,3% de todas as causas de mortes femininas e estima-se que sua incidência seja de 46 mulheres a cada 100.000 (ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE RASTREAMENTO DE CÂNCER DE MAMA, 2009).

Segundo Cassali (2000), os tumores mamários espontâneos caninos apresentam muitas semelhanças com os da espécie humana e são passíveis de serem utilizados como modelo experimental para estudos comparativos com a espécie. Assim sendo, podemos inferir que a identificação de ferramentas que possam auxiliar no prognóstico dos tumores mamários possibilitará a escolha de tratamentos mais adequados para o controle da doença, possivelmente beneficiando a ambas as espécies.

Os tumores de mama interferem na qualidade de vida dos pacientes, manifestando alterações clínicas que podem ser causadas pelos efeitos diretos do crescimento do tumor sobre os tecidos adjacentes ou, ainda, alterações hematológicas, endócrinas ou mesmo metabólicas correlacionadas aos tumores. Essas alterações são frequentemente nomeadas de síndromes paraneoplásicas, (VALADÃO, 2007).

As síndromes paraneoplásicas são responsáveis diretas por um decréscimo progressivo da qualidade de vida dos animais acometidos de

tumores. Expressam-se sob forma de inapetência, caquexia, prostração e muitas vezes dor, provavelmente relacionados também com a reação inflamatória local e sistêmica ao desenvolvimento tumoral, sendo que o componente inflamatório local, quando presente no esfregaço, pode, inclusive, revelar-se um fator negativo para o diagnóstico preciso das neoplasias mamárias (ZUCCARI *et al.*, 2001).

Estudos imunoistoquímicos têm revelado a expressão das enzimas cicloxigenases (Cox) em diversos tecidos. Tais enzimas são responsáveis pela síntese de prostaglandinas, e possuem várias isoformas. A Cox-1 tem sido relatada em quase todos os tecidos de forma fisiológica, enquanto Cox-2 se expressa geralmente induzida por algum processo patológico nos tecidos (PESTILI DE ALMEIDA *et al.*, 2001), tais como carcinomas mamários (De NARDI *et al.*, 2005; QUEIROGA *et al.*, 2010), carcinomas intestinais (LAVALLE *et al.*, 2009) e carcinomas espinocelulares de cães (PESTILI DE ALMEIDA *et al.*, 2001).

O primeiro estudo relacionando COX-2 a neoplasias mamárias em cadelas foi realizado por Doré *et al.*, (2003), os quais não encontraram expressão desta enzima em mamas normais e observaram sua expressão aumentada nos adenomas e adenocarcinomas mamários. Segundo Lavalle *et al.* (2009), existe uma correlação entre uma grande expressão de COX-2 com o aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, diminuição da apoptose e formação de novos vasos, indicando um pior prognóstico (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Esforços têm sido despendidos para se estabelecer técnicas de tratamento e prognóstico desta importante neoplasia canina, enfatizando-se a já clássica utilização do Sistema de Estadiamento Clínico dos Tumores, conhecido como TNM modificado por Owen (1980), que avalia o tamanho e grau de comprometimento de linfonodos e a possível presença de metástases, estabelecendo a extensão e gravidade da doença (CAVALCANTI e CASSALI, 2006). Da mesma forma, a imunoistoquímica tem sido indicada como promissora ferramenta preditiva (MORRIS, 2010) sendo a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) apresentada como marcador prognóstico (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Embora a classificação TNM seja preditiva quanto à sobrevida do paciente, existe a necessidade de uma avaliação mais específica quanto ao reflexo de tais tumores na qualidade de vida do indivíduo. Para tal fim, pode-se utilizar a escala de desempenho de Karnofsky (EDK), que avalia as habilidades funcionais do indivíduo no momento do exame (VALADÃO, 2007).

A avaliação repetida do animal pela EDK num determinado período de tempo correlacionada com os resultados do estadiamento do tumor, permite obter um resultado palpável sobre a avaliação da qualidade de vida em relação à evolução da doença e/ou às terapias efetuadas (VALADÃO, 2007).

REVISÃO DA LITERATURA

Aspectos epidemiológicos do tumor de mama

A glândula mamária é a localização anatômica mais comum para desenvolvimento de tumores nas cadelas (MORRISON, 2002; MARTINS *et al.*, 2003; NOVOSAD, 2003) e sua ocorrência, segundo Rassnick (2005), só é menor quando comparada ao tumores de pele, totalizando cerca da metade dos tumores diagnosticados na espécie. A sua ocorrência é rara em animais jovens, acometendo principalmente animais com idade média entre 9 e 11 anos (NELSON e COUTO, 2001; GALERA *et al.*, 2002; FOSSUM, 2002; MORRISON, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CAVALCANTI e CASSALI, 2006; HATORE *et al.*, 2011; GOMIDE *et al.*, 2012). Um estudo de GALERA *et al.* (2002), mostra, ainda, que a maior incidência é observada em cães de raça não definida, seguida dos cães das raças Pinscher e Cocker Spaniel.

MORRISON (2002) afirma que a idade ao 1º cio, a idade à 1ª gestação, o número de filhotes, a ocorrência de ciclos estrais anormais ou histórico de pseudogestação não demonstraram associação com o aparecimento destes tumores. Porém, outros autores afirmaram que o uso de progestágenos e a ocorrência de pseudogestações estão associados ao aparecimento precoce de neoplasias mamárias em cadelas (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Os tumores mamários podem ocorrer em qualquer região da cadeia mamária (NELSON e COUTO 2001), porém são mais comumente localizados nas glândulas inguinais (WALDRON, 2001; FOSSUM, 2002; GALERA *et al.*, 2002). Segundo Gomide *et al.* (2012), mais frequentemente a cadeia mamária esquerda (43,6%) foi afetada quando comparada com a direita (37,9%) ou com o acometimento bilateral (18,42%). Para Oliveira *et al.* (2003), a ocorrência nas mamas caudais é maior, representando 51,8% contra somente 5,9% nas mamas craniais e 36,5% em mamas caudais e craniais. Estes autores observaram, ainda, que 55,3% dos animais apresentam crescimentos em ambas as cadeias (direita e esquerda) e que 77,6% apresentam tumores múltiplos.

Macroscopicamente, os tumores de mama são representados em sua maioria por massas firmes e nodulares, as quais podem ser sésseis ou pedunculadas, sólidas ou císticas, ulceradas ou recobertas de pele e pelos, podendo seu tamanho variar de milímetros até alguns centímetros de diâmetro (NELSON e COUTO 2001; FOSSUM 2002; MISDORP, 2002). São frequentemente múltiplas (NELSON e COUTO, 2001; WALDRON, 2001; FOSSUM 2002; MISDORP, 2002), sendo importante a palpação de todas as glândulas e linfonodos regionais à procura de nódulos (WALDRON, 2001).

Aspectos biológicos dos tumores de mama

Considerados incomuns em cães machos (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002), os tumores malignos de mama são muito comuns em cadelas, sendo representados principalmente pelos carcinomas em 50% (FOSSUM, 2002; RASSNICK, 2005; CAVALCANTI e CASSALI, 2006) a 70-75% dos casos (OLIVEIRA *et al.*, 2003; STRATMANN *et al.*, 2008).

A ocorrência de outras formas histológicas é de 4% para os sarcomas, 4% para os carcinomas inflamatórios e 42% para os adenocarcinomas (MORRISON, 2002). De forma similar, Fossum (2002) estabelece que a maior parte dos tumores mamários malignos são carcinomas (carcinomas sólidos, adenocarcinomas tubulares, adenocarcinomas papilares e carcinomas anaplásicos), sarcomas (menos de 5%) e carcinossarcomas (também chamados de tumores mistos malignos), sendo que a incidência de metástase é mais alta nos sarcomas do que nos carcinomas.

Daleck *et al.* (1998) encontraram em procedimentos de mastectomia regional e de mastectomia em bloco uma frequência de carcinoma mamário de 52,17% e de tumores mistos de 17,39%. Hatore *et al.* (2011) encontraram 76,19% de carcinoma nos tumores mamários pelo exame citológico com aspirado por agulha fina. De forma semelhante, Gomide *et al.* (2012) estabelecem que 75% dos tumores apresentaram-se como malignos, sendo adenocarcinoma e tumor misto maligno os mais comuns. Porém, em 2001, Nelson e Couto afirmavam que os tumores benignos podiam representar até 50% dos casos das neoplasias mamárias na espécie canina.

Aspectos clínicos dos tumores de mama

Em geral, os proprietários percebem os nódulos vários meses antes de procurarem ajuda profissional veterinária (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002). Sabe-se que os tumores malignos têm um considerável poder metastático e que seu tipo histológico e o grau de invasão celular são relevantes na sobrevida do animal (MORRISON, 2002; RASSNICK, 2005). Segundo Morrison (2002), o tempo de sobrevida de cadelas com carcinoma invasivo (11,8 semanas) foi menos da metade em relação ao tempo de sobrevida das cadelas com carcinomas não invasivos (29 semanas). Para os demais tipos histológicos, o tempo médio de sobrevida foi de 24,6 semanas para o adenocarcinoma tubular, 6,5 semanas para o carcinoma sólido e 15,8 semanas para o carcinoma anaplásico.

Em relação às metástases, de acordo com Fossum (2002), as células tumorais se disseminam pelos vasos linfáticos e sanguíneos para linfonodos regionais e pulmões. A presença de metástase pulmonar determina um prognóstico desfavorável (NELSON e COUTO, 2001). Menos frequentemente, as metástases podem acometer as glândulas adrenais, rins, coração, fígado, ossos, cérebro e a pele. Stratmann *et al.* (2008) ressaltam que, ao contrário do que acontece nas mulheres, as metástases ósseas são pouco comuns em cães. Por serem similares aos nódulos de outras neoplasias, Morrison (2002) sugere a pesquisa sistemática de metástases em linfonodos e nos pulmões. Ocorrem metástases torácicas em 25 a 50% das cadelas com tumores mamários malignos; por conta disso, todos os animais que apresentem neoplasias mamárias devem ter o tórax radiografado (NELSON e COUTO, 2001; WALDRON, 2001; FOSSUM, 2002). A ultrassonografia abdominal também pode ajudar a detectar metástases (FOSSUM, 2002).

Morrison (2002) observou que 58% de cadelas submetidas à mastectomia regional para extração de tumores mamários desenvolveram nova lesão na mesma cadeia e apenas 3% na cadeia contralateral, com grande correlação entre os tumores quando o primeiro diagnóstico tenha sido maligno.

O estadiamento clínico da doença avaliando-se as características do tumor e suas consequências no animal permite a obtenção de informações

prognósticas, diagnósticas e terapêuticas (CAVALCANTI e CASSALI, 2006), possibilitando uma comparação entre a análise histopatológica e a observação clínica dos diversos estadios da doença (SOBIN e FLEMING, 1997).

O sistema TNM, que avalia o tumor, os linfonodos e a presença de metástases, permite a divisão dos casos clínicos em grupos caracterizados de acordo com a extensão da doença. Os parâmetros foram estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde para uso em mulheres (SORENMO, 2003), sendo posteriormente adaptada por Owen (1980), para utilização em cães (CASSALI *et al.*, 2011).

O tamanho do tumor primário tem grande correlação com o prognóstico de evolução, com a reincidência da doença e com a sobrevida do animal. Tumores menores que três cm mostraram taxa de recidiva próxima a 35% após dois anos, comparado a 80% em cadelas com tumores maiores (NELSON e COUTO, 2001; MORRISON, 2002; SORENMO, 2003). Além disto, Ferreira *et al.* (2009) observaram que cadelas que apresentavam lesões maiores que cinco cm, apresentavam maior incidência de tumores malignos, com rápida progressão da doença e menor expectativa de vida.

A avaliação dos linfonodos regionais para verificação de provável acometimento metastático é muito importante para a determinação do prognóstico (CASSALI *et al.*, 2011). Sorenmo (2003) observou que animais que tinham sinais de metástase em linfonodos regionais apresentaram uma sobrevida muito menor quando comparados àqueles que tinham linfonodos isentos de células tumorais.

A Escala de Desempenho Karnofsky (EDK) foi criada pelo médico americano Dr. David A. Karnofsky em 1949 como um método qualitativo caracterizando o impacto da doença sobre o paciente, medindo o seu desfecho nas habilidades funcionais e qualidade de vida antes e depois de alguma intervenção (Valadão, 2007). Estudos demonstram a confiabilidade e reprodutibilidade do método, mesmo sendo esta uma avaliação subjetiva (VALADÃO, 2007). A escala varia de 0 a 100, onde 100 representa vitalidade excelente e zero o óbito do paciente.

O local do tumor primário, bem como a localização, número e extensão das metástases estão associados ao declínio da qualidade de vida e

consequente queda no valor da EDK. Sendo assim, talvez possamos correlacionar de alguma forma o Sistema TNM e a EDK com o intuito de melhorar a avaliação da qualidade de vida e expectativa de prognóstico.

Contudo, a gradação da EDK original é específica para humanos, impedindo uma transposição linear para os animais. Couto (1998) propôs uma adaptação da escala usada em humanos para cães, simplificando e invertendo a escala, de modo que, numa escala de 0 a 4, “0” corresponde aos animais considerados hígidos e “4” correspondem àqueles em óbito.

Apesar da proposta de Couto (1998) ser mais simplificada, os intervalos são muito acentuados, impedindo a qualificação de alterações mais sutis do comprometimento das atividades do animal. Sendo assim, Valadão, em 2007, resgatou a proposta de Karnofsky para humanos, adaptando-a para realidade de cães acometidos por tumor venéreo transmissível, conseguindo bons resultados e alta reprodutibilidade (Quadro 1).

De acordo com a literatura consultada, torna-se claro que o diagnóstico precoce e a implementação urgente de tratamento são necessários para prevenção do crescimento tumoral e a ocorrência de metástases (MARTINS *et al.*, 2003; NOVOSAD, 2003) e que o estadiamento clínico e o tipo e gradação histológica dos tumores são de grande valor no estabelecimento de um diagnóstico e prognóstico clínico (CAVALCANTI e CASSALI, 2006).

Diagnóstico

A biopsia citológica com agulha fina pode ser considerada não confiável, uma vez que os tumores mamários são extremamente heterogêneos no seu aspecto histológico, não se prestando para realização de prognóstico (MORRISON, 2002; NELSON e COUTO, 2001). A observação de células inflamatórias no exame citológico é frequente e, neste exame, falsos diagnósticos de tumores benignos são comuns quando comparados ao diagnóstico histopatológico das massas retiradas cirurgicamente (WALDRON, 2001).

A confirmação diagnóstica é recomendada mediante biopsia

excisional, visto que com o exame histopatológico pode-se estabelecer um prognóstico que progride em gravidade conforme sejam encontradas células neoplásicas estendendo-se desde o epitélio do ducto para além do limite deste, invadindo vasos sanguíneos e linfáticos (NELSON e COUTO, 2001). Com o exame histopatológico pode-se, ainda, realizar os diagnósticos diferenciais desejados em relação à hipertrofia mamária, mastite, tumores cutâneos ou mesmo corpos estranhos (FOSSUM, 2002). Apesar destas observações, alguns autores acreditam haver certa eficiência nas punções biópsias por agulha fina no diagnóstico dos tumores de mama (DALECK *et al.*, 1998; ZUCCARI *et al.*, 2001).

Martins *et al.* (2003) afirmam que exames imunoistoquímicos em tumores mamários de cães acusam expressão irregular de tenascina e expressão difusa de fibronectina, sendo este resultado semelhante ao encontrado em tumores mamários humanos. Segundo este autor, os resultados contribuem para um melhor prognóstico das neoplasias mamárias e suas respectivas metástases, porém não explicitam a relação entre a expressão de fibronectina e tenascina com um melhor ou pior prognóstico. Outros autores, por sua vez, observaram que mais de 50% dos tumores de glândula mamária apresentaram sobre-expressão de COX-2 e, desta forma, sugeriram que as drogas inibidoras desta enzima possam ser úteis em uma terapia multimodal (RASSNICK, 2005).

Tratamento dos tumores de mama em cadelas

De acordo com a literatura, a metade dos casos de tumores mamários em cadelas podem ser bem controlados apenas com terapia local (excisão cirúrgica) (RASSNICK, 2005). As opções de tratamento variam de acordo com o estadiamento tumoral e podem incluir procedimento cirúrgico, radioterapia, quimioterapia ou a combinações destas (NOVOSAD, 2003). A excisão cirúrgica permite um diagnóstico histológico, podendo ser curativa, melhorar a qualidade de vida do animal ou modificar a progressão da doença (FOSSUM, 2002). Para Waldron (2001), é essencial a realização de tratamento agressivo devido ao seu grande potencial de malignidade e de gerar

metástases. A ausência de tratamento de qualquer tumor mamário não é recomendada, excluindo-se as situações em que outras doenças concomitantes possam impedir o diagnóstico ou tratamento. O procedimento cirúrgico pode ser nodulectomia, mastectomia regional ou radical, dependendo do número e tamanho dos nódulos. No entanto, existem controvérsias quanto à indicação de cada uma destas técnicas (NELSON e COUTO, 2001).

A extirpação cirúrgica adequada, com margens cirúrgicas livres de células tumorais, resulta em excelentes chances de controle local da doença. Pacientes com a doença já avançada, que tenham invasão tumoral em região vascular ou linfática, bem como metástases em linfonodos regionais, podem beneficiar-se de um tratamento quimioterápico adjuvante (NOVOSAD, 2003).

Cicloxygenases

Prostaglandinas são eicosanoides, compostos endógenos que exercem importante ação homeostática em praticamente em todas as células do organismo. Dentre seus efeitos biológicos, destacam-se seus efeitos na reprodução, no controle da pressão e do fluxo sanguíneo, na função renal, na formação de trombos, nos processos inflamatórios, no controle da musculatura lisa, na atividade neuronal e alguns processos patológicos, como as úlceras gástricas. As prostaglandinas exercem seus efeitos por meio da ligação a receptores específicos localizados nas membranas e que desencadeiam suas respostas pela ativação de proteínas regulatórias acopladas ao nucleotídeo guanina (PALERMO, 2002; BATIOUNI, 2010).

Estímulos fisiológicos, patológicos e farmacológicos (injúria) determinam a degradação de complexos fosfolipídicos constituintes das membranas celulares pela fosfolipase A_2 , acarretando a síntese de ácido araquidônico (o mais importante precursor das prostaglandinas, por originá-las em maior quantidade em praticamente todos os tecidos dos mamíferos). Numa segunda etapa, a atuação de enzimas denominadas cicloxygenases sobre o ácido araquidônico determina a formação de um endoperóxido cíclico instável (PGG_2), produto intermediário que é convertido em PGH_2 e que, por ação de enzimas denominadas prostaglandina-sintetases, dão origem às diversas

prostaglandinas (PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 , PGF_2) e a outros 2 compostos de relevância biológica: o tromboxano A_2 (TXA_2) e as prostaciclina (PGI_2) (PALERMO, 2002; BATIOUNI, 2010).

As cicloxigenases existem em três isoformas: COX-1, COX-2 e COX-3, sendo as duas primeiras de importância clínica. A COX-1 está relacionada a respostas fisiológicas dos tecidos como citoproteção do estômago, agregação plaquetária, controle vascular e manutenção do fluxo renal (BRUNE e HINZ, 2004; HILÁRIO *et al.*, 2006). Esta isoforma está presente em quase todos os tecidos (vasos sanguíneos, plaquetas, estômago, intestino e rins), sendo considerada uma enzima constitutiva (HILÁRIO *et al.*, 2006). Diferentemente, a COX-2 é considerada responsável primária pela síntese de prostanóides envolvidos na resposta inflamatória aguda e crônica e está presente nos focos inflamatórios. Denominada de enzima indutiva (HILÁRIO *et al.*, 2006), é expressa por células tais como macrófagos, monócitos e sinoviócitos (BRUNE e HINZ, 2004).

Recentemente demonstrou-se que ambas as isoformas (COX-1 e COX-2) estão envolvidas tanto em eventos fisiológicos quanto patológicos, sendo ambas necessárias para a citoproteção gástrica e contribuindo para o funcionamento normal dos rins, por meio da regulação do fluxo renal e do tônus vascular (GRANGEIRO *et al.*, 2008). Além disto, Tran-Thanh *et al.* (2010) observaram uma correlação positiva entre a expressão de COX-2 e o Fator de Crescimento Vascular (VEGF) e, Millanta *et al.* (2006) correlacionaram a COX-2 com o Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2).

LAVALLE *et al.*, (2009) ressaltam, ainda, que a prostaglandina E_2 (PGE_2), produto catalítico da COX-2, altera os mecanismos da apoptose, diminuindo sua indução nos tecidos.

Outro estudo demonstrou por exames imunoistoquímicos que não há expressão de COX-2 em glândulas mamárias saudáveis, porém há baixa expressão nos adenomas e grande expressão nos adenocarcinomas, o que reforça a possível associação direta entre malignidade do tumor e a expressão de COX-2 (HALF *et al.*, 2002).

Neoplasias X Cicloxigenases

Como é uma importante enzima na biossíntese de prostaglandinas, a COX-2 é expressa em vários tumores em humanos e animais, inclusive em cânceres mamários. Estudos *in vitro* demonstraram que células de tumores mamários caninos apresentam grande expressão de COX-2, acarretando em elevada síntese de PGE₂ e contribuindo, assim, para o processo de tumorigênese (BRUNELLE *et al.*, 2006). Outros autores relatam 100% de imunorreatividade de carcinomas mamários caninos para COX-2, correlacionada com a superexpressão do fator de crescimento epidérmico humano HER-2 (MILLANTA *et al.*, 2006). No entanto, Costa *et al.* (2011) acreditam não haver relação entre a expressão de COX-2 e a evolução tumoral.

Alguns trabalhos indicam que a expressão de COX-2 em neoplasias mamárias corresponde a uma menor expectativa de vida, ou seja, um pior prognóstico e que animais com baixa densidade vascular e com baixa expressão de COX-2 apresentam sobrevivência significativamente mais prolongada (MILLANTA *et al.*, 2006; LAVALLE *et al.*, 2009). Outros autores relatam um decréscimo da expressão das prostaglandinas frente à inibição das COX-2 em estudos *in vitro* em culturas celulares (BRUNELLE *et al.*, 2006).

Sabe-se, ainda, que com a maior expressão de COX-2 ocorre uma diminuição da apoptose, promovendo o desenvolvimento tumoral e a angiogênese local. Isso é bem investigado em cânceres humanos graves (LAVALLE *et al.*, 2009), particularmente carcinomas ductais com maior volume e alta taxa proliferativa (ROBERTSON *et al.*, 2007). Essa enzima é encontrada abundantemente em 40% dos carcinomas mamários (HOWE *et al.*, 2005) e correlaciona-se positivamente com o aumento da angiogênese, crescimento tumoral e capacidade de metástase linfonodal (LAVALLE *et al.*, 2009, COSTA *et al.*, 2011).

A partir dessas observações, sugere-se que o tratamento com drogas inibidoras das COX-2 (anti-inflamatórios não esteroidais) possa ser uma boa estratégia para prevenção e tratamento das neoplasias mamárias em

cadela (HALF *et al.*, 2002; MILLANTA *et al.*, 2006; LAVALLE *et al.*, 2009).

Costa *et al.* (2011) não observaram relação significativa entre a expressão de COX-2 e idade ou grau do tumor mamário, mas sugerem ainda que tal expressão parece ser um evento tardio na progressão tumoral, não se relacionando com a tumorigênese.

Inibidores das cicloxigenases

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são medicamentos frequentemente prescritos ao redor do mundo. São inibidores das cicloxigenases (COX), seletivos ou não. Os não seletivos são os AINEs denominados de tradicionais ou convencionais, que apresentam mais efeitos adversos (pois inibem tanto COX-1, quanto COX-2), principalmente gástricos. Por isso, foram desenvolvidos AINEs seletivos para inibição da COX-2 os chamados COXIBEs. Destes, os mais testados na medicina são celecoxibe, valdecoxibe, rofecoxibe, enterocoxibe e lumiracoxibe (BATIOUNI, 2010). Os estudos indicam que a inibição seletiva da COX-2 possa apresentar ação anti-inflamatória semelhante à dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), sem ocasionar efeitos colaterais gastrintestinais.

Os inibidores seletivos de COX-2 exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, como o aumento de risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial. Estes riscos são maiores em pacientes humanos com histórico de doenças correlacionadas (BATIOUNI, 2010). Esses fármacos possuem eficácia analgésica e anti-inflamatória, porém com tolerabilidade superior. A inibição específica de COX-2 bloqueia a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI_2 , diminuindo a excreção de sódio, acarretando edema e elevação da pressão sanguínea. Além disso, a sua inibição altera o equilíbrio entre o tromboxano A_2 (TXA_2), derivado das plaquetas, e a prostaglandina (PGI_2) derivada do endotélio, aumentando o risco de trombozes e infartos, devendo-se ter uma avaliação criteriosa na escolha da terapia entre os AINEs e os COXIBEs (GRANGEIRO, *et al.*, 2008).

HALF *et al.* (2002) relatam que a superexpressão do gene

responsável pela COX-2 em ratos transgênicos foi suficiente para a indução da tumorigênese. Doré *et al.* (2003) ressaltam, ainda, que a indução de COX-2 em tumores mamários humanos determinou a redução nos níveis de proteínas pro-apoptóticas (Bax e Bcl-xl) e um aumento nas proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2).

Um estudo realizado em camundongos transgênicos Her-2/neu com carcinoma ductal *in situ*, não demonstrou prevenção ou controle do crescimento tumoral, bem como de metástases, em animais tratados com Celecoxibe. No entanto, o fármaco teve como efeito a diminuição na expressão do fator de crescimento vascular (VEGF), apontado como principal fator angiogênico das neoplasias mamárias (TRAN-THANH *et al.*, 2010).

Em contrapartida, em estudo semelhante realizado por Basu *et al.* (2004) com o mesmo fármaco (celecoxibe), também em camundongos transgênicos, observou-se redução significativa no peso do tumor mamário associado à apoptose e diminuição da proliferação celular *in vivo*. A diminuição da proliferação celular está correlacionada com a diminuição da ativação da proteína quinase B/Akt, cujo aumento leva a maior sobrevivência celular, com expressão aumentada da proteína pro-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

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

Entretanto, a administração do mesmo fármaco por noventa dias para cães idosos (idade superior a sete anos) acarretou em alguns efeitos colaterais, tais como: diarreia, vômitos, fezes escuras e anorexia discreta (JOUBERT, 2009).

OBJETIVOS

Pela alta frequência dos carcinomas mamários em cães, pelas semelhanças existentes entre o tumor mamário canino e humano, pela expressão exagerada de Cox-2 nestas neoplasias em ambas as espécies, e por sua relação com seu comportamento biológico, este trabalho tem por objetivos:

- ✧ Estudar prospectivamente a expressão de Cox-2 em carcinomas mamários de cadelas;
- ✧ Avaliar o efeito do firocoxibe sobre a expressão de Cox-2 nos tumores mamários em cadelas;
- ✧ Avaliar os efeitos do uso do firocoxibe nos parâmetros clínicos e laboratoriais em cadelas com tumor de mama.
- ✧ Verificar o efeito do procedimento da biópsia incisional sobre os parâmetros clínicos e laboratoriais das cadelas, bem como os resultados histopatológicos comparados com a biópsia excisional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

O presente trabalho foi realizado no Centro Veterinário do curso de Medicina Veterinária da Universidade PUC Minas *Campus* Poços de Caldas-MG.

Animais

O projeto deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESP Botucatu sob protocolo nº150/2011.

Foram selecionadas 19 fêmeas caninas, adultas com diagnóstico de neoplasia mamária atendidas. Os animais foram triados pelo atendimento ambulatorial da universidade durante o período de setembro de 2011 a agosto de 2012 e pertenciam às seguintes raças: Poodle (6), sem raça definida (6), Teckel (2), Pinscher (1), Boxer (1), Rotweiller (1), Pitbull (1) e Maltês (1). Apresentando peso médio de 10,05 Kg variando de 3,5 a 31Kg.

Os proprietários foram esclarecidos sobre o protocolo proposto no presente estudo e assinaram o termo de livre consentimento esclarecido antes da realização dos procedimentos.

Para que fossem considerados aptos para a inclusão no experimento, os animais deveriam cumprir os seguintes requisitos:

- ✧ Apresentar pelo menos um nódulo mamário;
- ✧ Gozar de saúde suficiente para se submeter a procedimentos anestésicos;
- ✧ Possuir autorização por escrito do proprietário para participar do estudo.
- ✧ Não apresentar doença concomitante;
- ✧ Não ter feito uso prévio recente de antibióticos e/ou anti-inflamatórios e/ou drogas antineoplásicas.

Avaliação clínica

Todos os animais tiveram os nódulos dos tumores mamários mensurados com paquímetro, mapeados quanto à localização dos crescimentos, ao antímero e mama acometida (mamas inguinais, abdominais caudais e craniais, torácicas caudais e craniais) bem como avaliação de possível envolvimento dos linfonodos regionais palpáveis.

Utilizou-se ainda como um método qualitativo caracterizando o impacto da doença sobre o paciente, a Escala de Desempenho Karnofsky adaptada para caninos por Valadão (2007) de acordo com o descrito em Quadro 1.

Realizaram-se exames radiográficos de tórax, com exposição látero-lateral e ventro-dorsal com o intuito de pesquisar presença de possíveis metástases pulmonares.

QUADRO 1. EDK adaptada para caninos (VALADÃO, 2007).

EDK	Descrição clínica
100	Vitalidade excelente, canino sem nenhuma evidência de doença.
90	Vitalidade muito boa, presença de afecção em um órgão ou sistema.
80	Vitalidade boa, mais de um órgão ou sistema apresentando afecção.
70	Vitalidade satisfatória; acometimento mais severo de um órgão ou sistema.
60	Vitalidade regular, ligeira inapetência.
50	Vitalidade irregular, inapetência significativa, comprometimento acentuado de órgãos e sistemas.
40	Vitalidade baixa; canino ainda se mantém em estação, porém não responde ao tratamento sintomático.
30	Vitalidade muito baixa; permanece pouco tempo em estação, necessita de nutrição parenteral, precisando ainda ser contido.
20	Vitalidade extremamente baixa, canino permanece em decúbito, se levantando apenas para urinar e defecar e durante nutrição parenteral não necessita ser contido.
10	Ausência de vitalidade, permanente decúbito.
0	Falecido.

Grupos

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais, sendo o controle com nove animais e o grupo tratado com 10 animais.

No primeiro dia experimental (D0), os animais de ambos os

grupos foram avaliados e submetidos a colheita de sangue para exames laboratoriais e colheita de biópsia incisional dos tumores. No período de 7 dias (D0 a D7) a partir deste primeiro momento, os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum tratamento e os animais do grupo tratado receberam 5mg/Kg/dia de Firocoxibe (Previcox®) SID, por via oral.

Ao final deste período de sete dias (D7), os animais de ambos os grupos retornaram para a realização da cirurgia, colheita de sangue e colheita da biópsia excisional. A opção entre mastectomia em bloco ou radical foi feita de acordo com o estadiamento clínico.

Estadiamento clínico

Utilizou-se para fins de estadiamento clínico o sistema TNM modificado de Owen (1980), o qual baseia-se no tamanho do tumor primário (T), envolvimento de linfonodos (N) e existência de metástases distantes (M), conforme Quadro 2.

QUADRO 2. Estadiamento clínico (TNM) de carcinomas mamários segundo Owen (1980)

Tumor primário (T)	Linfonodo Regional (N)	Metástase (M)
T0 – sem evidência de tumor primário	N0 – sem metástase linfonodal regional (inguinal ou axilar)	M0 – sem metástases a distância
T1 – Tamanho < 3cm a: não aderido b: aderido a pele c: aderido ao músculo	N1 – linfonodo ipsilateral comprometido a: não aderido b: aderido	M1 – metástase a distância, incluindo linfonodos distantes.
T2 – tamanho 3 a 5 cm a: não aderido b: aderido a pele c: aderido ao músculo	N2 – Comprometimento linfonodal bilateral a: não aderido b: aderido	
T3 – Tamanho > 5cm a: não aderido b: aderido a pele c: aderido ao músculo		
T4 – tumor de qualquer tamanho (carcinoma inflamatório)		

Protocolo anestésico

O protocolo utilizado para anestesia geral foi idêntico para todos os animais. Para fins de biópsia incisional, utilizou-se o protocolo padrão anestésico utilizando-se como medicação pré-anestésica a acepromazina 0,1mg/Kg e a meperidina 2,0mg/Kg, por via intramuscular. Para a anestesia propriamente dita utilizou-se infusão de propofol a 5mg/Kg intravenoso e redosagens em *bolus* quando o animal apresentava sinais de superficialização, tais como taquicardia e presença de reflexo palpebral.

O procedimento anestésico para a mastectomia seguiu o mesmo protocolo pré-anestésico seguido de indução anestésica com propofol 5mg/Kg intravenoso. Após a indução, foi feita intubação orotraqueal e manutenção com a utilização de anestesia inalatória com mistura gasosa de oxigênio a 100% e isoflurano ao efeito.

Protocolo cirúrgico

Após medicação pré-anestésica, os animais foram tricotomizados e tiveram seus nódulos mamários contados, mensurados e o método cirúrgico escolhido de acordo com a recomendação de Daleck *et al.* (1998), conforme o Quadro 3. No caso de várias mamas estarem afetadas, foi retirada toda a cadeia mamária envolvida. Quando a cadeia contralateral estava afetada, foi marcado outro procedimento após 30 dias.

QUADRO 3. Recomendação do protocolo cirúrgico conforme Daleck *et al.* (1998).

MAMA AFETADA	PROCEDIMENTO
Torácica cranial	Retirada da mama afetada
Torácica caudal	Mastectomia regional torácica
Abdominal cranial	Retirada de toda cadeia mamária
Abdominal caudal	Mastectomia regional inguino-abdominal
Inguinal	Retirada da mama afetada

Processamento das amostras

Os fragmentos retirados a bisturi com excisão em cunha durante a biópsia incisional foram imediatamente fixados em solução de formalina neutra tamponada a 10 % e encaminhados ao laboratório de histopatologia para processamento, segundo as técnicas rotineiras para inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

Os fragmentos de biópsia excisional foram colhidos com espessura de, no máximo, 1,0cm, após o término do procedimento cirúrgico para mastectomia e foram igualmente fixados e processados para fins histopatológicos.

Imunoistoquímica

O método de imunoistoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB). Resumidamente, os cortes de tecido foram distendidos em lâminas carregadas e permaneceram em estufa 57 °C por 24 horas e posteriormente foram desparafinados com xilol e reidratados em álcool etílico em concentrações decrescentes. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando solução de Citrato de sódio pH 6,0 em panela de pressão (Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 segundo a aproximadamente 128°C. Após

essa etapa, os cortes ficaram por 20 minutos na bancada para diminuir a temperatura e posteriormente foram lavados em água deionizada. As lâminas foram incubadas em dois banhos de peróxido de hidrogênio 3% (10V) durante 10 minutos em cada etapa, para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada por cinco minutos. Os cortes foram submetidos ao bloqueio de proteínas inespecíficas com leite em pó desnatado a 3%, com incubação por uma hora.

Os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti-COX2 (CX-294, Dako, Carpinteria, CA, USA) na diluição de 1:50 e, então, incubados a 4°C *overnight* (18 horas). Depois os cortes foram novamente lavados em solução tampão de TRIS. Em seguida as lâminas foram incubadas com polímero Advance (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas com TRIS três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se 3,3' *diaminobenzidine tetrachloride* (Dako, Carpinteria, USA). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina Harrys e desidratados em concentrações crescentes de álcool e xilol. Em seguida, as lâminas foram montadas com resina e lamínula. Carcinomas sabidamente positivos para COX-2 foram empregados como controle positivo. Para controle negativo as amostras receberam tratamento com o *Universal Negative Control Mouse* (Dako, Carpinteria, USA).

Classificação das amostras

As amostras de neoplasias mamárias foram histologicamente classificadas sob microscopia óptica de luz, segundo o *Consensus* para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento para Tumores Mamários Caninos (Cassali *et al.*, 2011) e agrupadas para fins estatísticos em: Carcinoma em tumor misto (1); Carcinoma (2) e, Tumor misto benigno (3).

As lâminas de imunoistoquímica foram avaliadas sob microscopia óptica de luz e graduadas em: sem expressão de COX2 (0), baixa expressão (1), moderada expressão (2) e intensa expressão (3).

Análises laboratoriais

Em ambos os momentos experimentais (D0 e D7) foram colhidas amostras de sangue via punção venosa jugular, em frascos estéreis com e sem EDTA, para realização de hemograma e exames bioquímicos séricos (ureia, creatinina, AST, ALT e proteína plasmática total). Tais amostras foram remetidas, imediatamente após o procedimento cirúrgico, ao laboratório de análises clínicas, onde foram processadas pelos métodos rotineiros nos laboratórios da PUC campus Poços de Caldas.

Análise Estatística

Para comparação dos parâmetros volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e níveis séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT e proteínas totais (PT) entre os grupos nos dois momentos experimentais foi feita análise de variância (ANOVA) e, nos casos em que foi verificada diferença significativa, as médias foram submetidas ao teste de Tukey para avaliar a interação entre os fatores.

O teste t de Student para amostras pareadas foi utilizado para comparação, em média, do efeito do momento experimental (D0 e D7) sobre os parâmetros avaliados em cada grupo.

As proporções de cada tipo de classificação dos tumores nos dois momentos experimentais em cada grupo foram comparadas pelo teste de McNeimar para amostras pareadas.

Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de 5% de significância.

RESULTADOS

As Tabelas 1 e 2 apresentam a distribuição dos animais quanto ao número de nódulos e a distribuição anatômica dos nódulos, respectivamente.

TABELA 1. Número de nódulos mamários nas cadelas estudadas.

Número de Nódulos	Número de animais	%
1	4	21,05
2	2	10,53
3	6	31,58
4	3	15,79
5	1	5,26
>5	3	15,79
Total	19	100

TABELA 2. Distribuição anatômica dos nódulos mamários nas cadelas estudadas.

Localização dos Nódulos	Número de Animais	%
Somente inguinais	4	21,05
Somente abdominais	3	15,78
Somente torácicos	2	10,52
Inguinais e torácicas	4	21,05
Inguinais e abdominais	4	21,05
Abdominais e torácicas	2	10,52
Todos os grupos mamários	4	21,05
Total	19	100

Quanto à classificação EDK, observou-se que todos os animais em ambos os grupos foram avaliados com EDK 90, tanto antes como após o tratamento cirúrgico, independentemente da utilização ou não de Firocoxibe.

Os valores encontrados nas avaliações dos tumores - volume do maior nódulo, classificação do tumor segundo Cassali *et al.* (2011), expressão de COX-2 - e nas avaliações laboratoriais das amostras de soro sanguíneo - uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais - estão apresentados nas Tabelas 3 e 4 respectivamente para os grupos controle e tratado.

Nos parâmetros laboratoriais estudados, os valores encontrados estavam dentro dos valores normais para a espécie, mesmo nos casos em que houve variação.

Os resultados da análise estatística dos dados obtidos nas avaliações dos tumores (volume do maior nódulo e expressão de COX-2) e nas avaliações laboratoriais das amostras de soro sanguíneo - uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais - estão apresentados na Tabela 5.

Os resultados mostram que os níveis de ALT foram diferentes entre os grupos no momento inicial do experimento ($p=0,019$) e que houve redução significativa no grupo controle entre os dois momentos de avaliação ($p=0,033$). No grupo tratado não foi verificada variação neste parâmetro.

O resultado do teste *t* mostrou que houve redução altamente significativa nos níveis séricos de proteínas totais entre os dois momentos de avaliação no grupo tratado ($p=0,006$). Essa redução não foi verificada no grupo controle.

Os níveis séricos de uréia também foram significativamente afetados pelo tratamento, apresentando aumento no segundo momento de avaliação no grupo tratado ($p=0,014$), sem alteração significativa no grupo controle.

O teste *t* mostrou que a expressão de COX-2 teve um crescimento significativo entre os dois momentos de avaliação no grupo controle ($p = 0,035$), o que não foi verificado no grupo tratado.

Nos demais parâmetros estudados – volume do maior nódulo, creatinina e AST - não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ou entre os momentos de avaliação.

TABELA 3. Dados dos parâmetros idade, número de nódulos (No. NOD), classificação do tumor (CLASS), volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e valores séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT, proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas no grupo controle nos dois momentos experimentais (D0 e D7).

Animal	Idade	N.Nod	CLASS		VMN (cm)		COX2 (escore 0-3)		UR (mg/dL)		CRE (mg/dL)		AST (UI/L)		ALT (UI/L)		PT (g/dL)	
			D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7
1	9	5	3	1	4,55	3,042	1	2	45	37	1,1	1,2	20	15	20	18	7,2	8,4
2	9	6	3	1	0,125	0,125	1	2	64	46	0,6	1	10	12	31	28	6	6,8
3	5	1	2	2	25,532	21,85	1	1	31	39	1,3	1,4	15	10	36	26	5,8	5,8
4	10	1	3	3	70,875	74,75	0	0	36	43	1	0,5	17	15	29	20	9,2	9,4
5	11	3	1	1	8,82	9,24	1	1	37	42	1,1	1,3	10	15	41	35	8,2	6,8
6	4	3	3	1	6,16	7,56	0	1	45	48	0,9	0,9	15	10	31	38	5	5,4
7	9	6	1	1	22,77	28,594	1	1	35	33	0,6	0,6	10	12	20	15	7	6,2
8	7	3	1	1	72,08	72	1	2	59	37	0,7	0,8	10	20	10	5	7	4,4
9	12	4	1	1	36,9	41,04	0	0	46	39	0,8	0,8	15	12	20	15	6,4	7

TABELA 4. Dados dos parâmetros idade, número de nódulos (No. NOD), classificação do tumor (CLASS), volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e valores séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT, proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas no grupo tratado nos dois momentos experimentais (D0 e D7).

Animal	Idade	N.Nod	CLASS		VMN (cm)		COX2 (escore 0-3)		UR (mg/dL)		CRE (mg/dL)		AST (UI/L)		ALT (UI/L)		PT (g/dL)	
			D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7
1t	9	3	1	1	3,24	3,6	1	0	33	36	1	1,1	15	34	18	30	7,4	6
2t	5	2	3	3	1,6	1,5	1	1	42	46	1,2	1,3	20	15	36	31	7	6,4
3t	8	1	1	1	25	35	1	0	37	39	0,9	0,6	10	5	10	26	6,2	6,2
4t	10	7	2	1	7,8	5,98	1	0	41	65	0,9	1,3	15	40	10	34	5	4,4
5t	8	1	1	1	22,5	22,95	2	0	46	83	2,3	2,2	20	15	15	10	8,6	8
6t	13	3	2	2	35	42,84	0	1	12	27	0,6	0,7	10	10	12	10	5,8	5,2
7t	11	3	3	1	16,69	13,65	0	3	22	24	0,6	0,4	15	10	15	10	8	6,4
8t	11	4	3	1	7,42	8	1	1	20	46	0,5	0,7	10	10	10	20	6,6	6,4
9t	7	4	3	2	2,5	3,15	1	0	33	40	0,6	1	10	5	20	20	5	4,8
10t	12	2	1	1	3,38	3,38	2	1	60	62	0,9	1	30	28	15	12	7,6	5,4

TABELA 5. Médias e desvio padrão (DP) dos parâmetros volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e níveis séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT e proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas nos grupos controle e tratado nos dois momentos experimentais (D0 e D7).

Grupo	VMN		COX2		UR		CRE		AST		ALT		PT		
	(cm)		(escore 0-3)		(mg/dL)		(mg/dL)		(UI/L)		(UI/L)		(g/dL)		
	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	
Controle	Média	27.5347	28.689	0.6667	1.1111	44.2222	40.4444	0.9	0.9444	13.5555	13.4444	26.4444	22.2222	6.8667	6.6889
(n=9)			a	b							A, a	b			
DP	27.531 3	28.493 8	0.5	0.7817 2	11.144	4.7463	0.2449	0.3087	3.7118	3.1667	9.6580	10.509 3	1.2728	1.5136	
Tratado	Média	12.513	14.005	1.0	0.7	34.6	46.8	0.95	1.03	15.5	17.2	16.1	20.3	6.72	5.92
(n=10)					a	b					B	a	B		
DP	11.6222 8	14.712 8	0.6667	0.9487	14.001 6	18.286 6	0.5233	0.5078	6.4334	12.389 9	7.7953	9.5225	1.2264	1.0250	

Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os momentos de avaliação no mesmo grupo.

Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa (p<0,05) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

Com relação à classificação dos tumores, embora não tenha sido demonstrada diferença significativa na proporção dos tipos de classificação entre os momentos de avaliação, o teste de McNeimar sugeriu uma tendência ($p=0,08$) de aumento no tipo 1 nas amostras da segunda colheita. A avaliação histopatológica das amostras mostrou sinais claros de malignidade na maioria dos fragmentos retirados por biópsia excisional, independentemente do tamanho do tumor primário ou do grupo experimental (Figura 1), o que não foi verificado no primeiro momento de avaliação, quando as amostras foram colhidas por biópsia incisional. Esta comparação entre as proporções de cada tipo de tumor nos dois momentos de avaliação está representada na Figura 2.

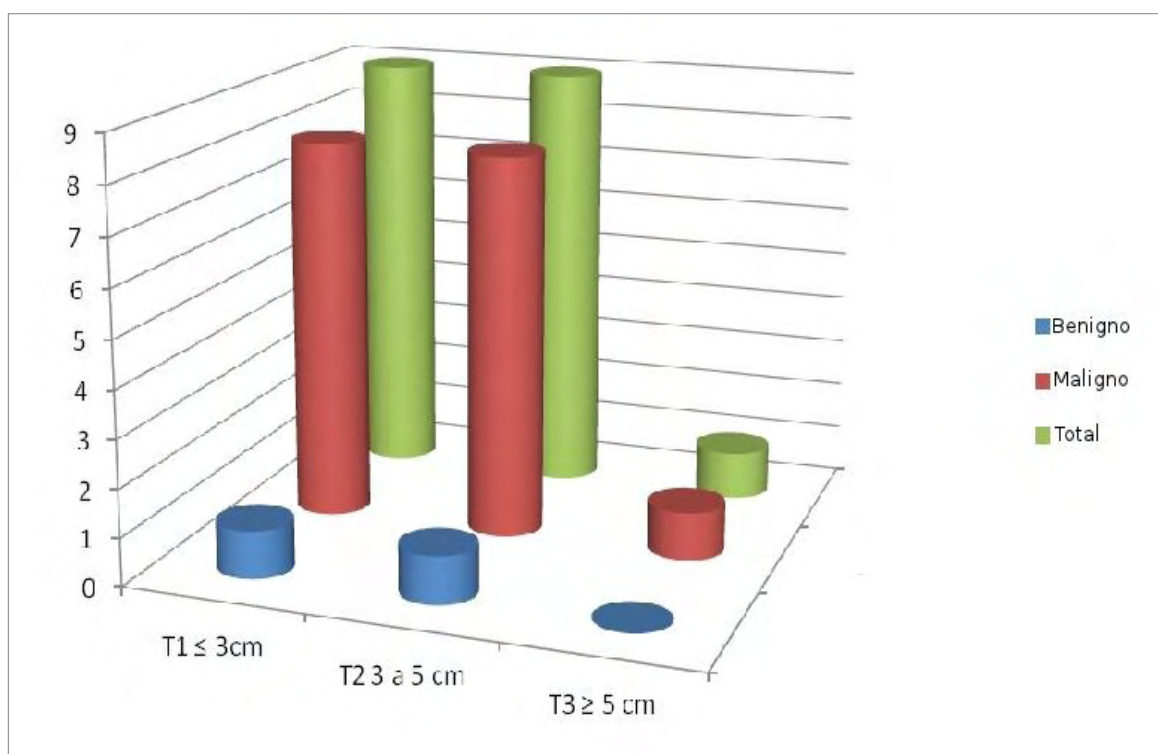


FIGURA 1. Representação gráfica da proporção média de tumores malignos de acordo com o tamanho do maior nódulo

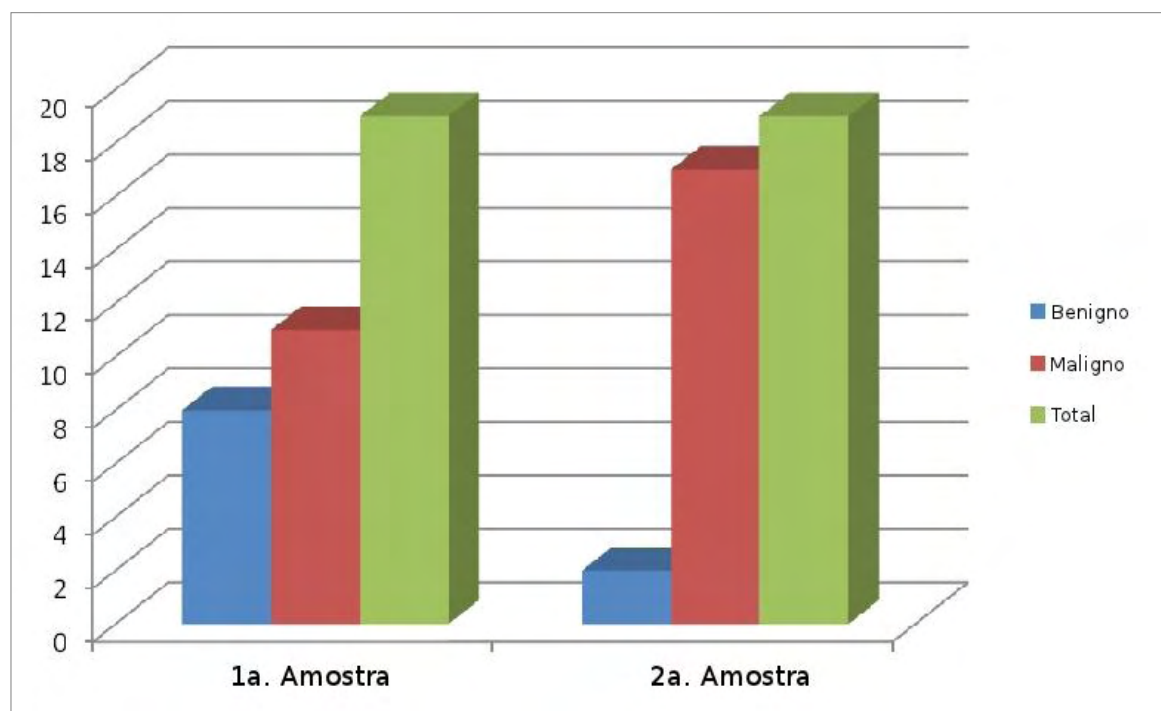


FIGURA 2. Representação gráfica da comparação entre as proporções médias de cada tipo de tumor nos dois momentos de avaliação.

DISCUSSÃO

A literatura a respeito dos tumores mamários em cadelas relata maioria de tumores malignos, embora a taxa varie entre os relatos. Oliveira *et al.* (2003), avaliando 152 resultados morfológicos de neoplasias mamárias em cadelas, encontraram 150 casos de tumores malignos. Em outros trabalhos, porém, a taxa de tumores malignos em cadelas foi menor, em torno de 75% (HATORE *et al.*, 2011; GOMIDE *et al.*, 2012). No presente estudo, a avaliação histopatológica evidenciou maioria de tumores malignos (89,47%).

A idade média dos animais utilizados neste estudo (8,95 anos) foi de acordo com a idade das cadelas acometidas por tumores mamários em muitos relatos encontrados na literatura (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002; GALERA *et al.*, 2002; MORRISON, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CAVALCANTI e CASSALI, 2006; GOMIDE *et al.*, 2012).

Em relação ao número e tamanho dos nódulos mamários, observou-se uma alta frequência de lesões múltiplas e de variado tamanho, como descrito por Cassali *et al.* (2011) no consenso sobre tumores mamários e também concordando com a maioria dos autores (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002; MISDORP, 2002). Estas características morfológicas indicam como opção terapêutica a mastectomia radical, de acordo com as orientações de Fossum (2002).

Diversos relatos da literatura (WALDRON, 2001; FOSSUM, 2002; GALERA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003) indicam maior incidência de tumores nas mamas caudais (abdominais e inguinais), o que também foi verificado neste trabalho.

No presente trabalho, não foram identificados sinais de metástase pulmonar, pelo exame radiográfico, em qualquer dos animais estudados. Por outro lado, nos animais que apresentaram alteração macroscópica dos linfonodos regionais, foram diagnosticadas lesões malignas nas mamas. Segundo Sorenmo (2003), animais com sinais de metástase em linfonodos regionais têm uma sobrevida menor em relação àqueles isentos de lesão, o que leva à indicação de acompanhamento mais estreito desses animais após o

tratamento cirúrgico.

Os tumores de classificação T3 segundo TNM (maiores que 5 cm) observados no presente trabalho foram diagnosticados como malignos, confirmando a tendência descrita por Ferreira *et al.*, (2009). Contudo, não se encontrou nos dados avaliados uma correlação entre o tamanho do tumor e grau de malignidade do mesmo. Tumores T1 e T2 também apresentaram resultados de malignidade, motivando uma intervenção rápida e radical para o tratamento e aumento da sobrevida do animal (NELSON e COUTO, 2001; FOSSUM, 2002).

O resultado da classificação dos tumores apresentou diferenças entre os dois momentos experimentais, de modo que alguns tumores previamente diagnosticados como benignos no primeiro exame por biópsia incisional tiveram classificação de carcinoma ou tumor misto maligno ao segundo exame por biópsia excisional. Relatos semelhantes foram apresentados em trabalhos que compararam a biópsia aspirativa com agulha fina e a biópsia excisional no momento da mastectomia (DALECK *et al.*, 1998; ZUCCARI *et al.*, 2001), embora estes autores afirmem ser confiável o diagnóstico inicial como fator prognóstico. Contudo, Cassali *et al.* (2011) afirmam que há grande heterogeneidade no aspecto histológico dos tumores de mama, não sendo confiável o diagnóstico por biópsia por agulha fina (MORRISON, 2002; NELSON e COUTO, 2001; WALDRON, 2001).

O fato da biópsia incisional não poder ser realizada em camadas mais profundas, além do fragmento ser normalmente pequeno, incorre no risco de se obter uma amostra não representativa do tumor. A diferença entre alguns resultados obtidos entre a primeira e segunda colheita sugere que a biópsia excisional tem maior confiabilidade do que a biópsia incisional e, portanto, que a incisional não deve ser utilizada para estabelecer um prognóstico para o animal. A indicação, portanto, é que se realize o tratamento considerando-se sempre a hipótese do tumor ser maligno (FOSSUM, 2002, WALDRON, 2001) e que se estabeleça um diagnóstico definitivo após a mastectomia e avaliação do material obtido neste procedimento (CASSALI *et al.*, 2011).

O fato dos animais deste experimento terem passado por triagem,

com o objetivo de excluir aqueles com doenças concomitantes ou tratamentos prévios resultou na seleção de animais considerados saudáveis quanto à avaliação de qualidade de vida pela Escala de Desempenho Karnofsk (EDK) modificado por Valadão (2007). Todos os animais avaliados apresentaram-se no estágio EDK 90 e não foi verificada diferença entre os grupos ou ao longo do experimento, ao contrário do relato de Valadão (2007), que observou melhora na qualidade de vida de animais portadores de Tumor Venéreo Transmissível após o tratamento e remissão da doença. Entretanto, foi possível observar, ainda, que os animais não apresentaram decréscimo da qualidade de vida, quer pela realização da biópsia incisional, quer pela administração do firocoxibe nas doses recomendadas.

Todos os resultados dos parâmetros laboratoriais obtidos no presente trabalho se apresentaram dentro da faixa de normalidade para espécie, segundo os padrões de Kaneko *et al.* (1997), em concordância com os resultados descritos por Steagall *et al.* (2007). Contudo, alguns dos parâmetros bioquímicos sofreram alterações significativas durante o experimento.

A enzima alanina transaminase (ALT), que indica lesão dos hepatócitos (DUNN, 2001; ANDRADE, 2002), diminuiu significativamente nos animais do grupo controle no segundo momento de avaliação ($p=0,33$). Os valores do primeiro momento de avaliação no grupo controle foram também significativamente maiores que aqueles encontrados no grupo tratado neste mesmo momento ($p=0,019$). Possivelmente este resultado seja devido a alguns animais terem apresentado valor discrepante na primeira coleta, ainda que dentro dos limites de normalidade para a espécie. Como a meia vida desta enzima é de apenas poucas horas após alguma lesão hepática (ANDRADE, 2002), não se pode caracterizar uma continuidade da lesão.

Os níveis séricos de uréia no grupo tratado foram, em média, maiores no segundo momento de avaliação, em contradição aos resultados obtidos por Steagall *et al.* (2007), que avaliaram cães saudáveis tratados com firocoxibe e não encontraram tal alteração. Entretanto, um estudo recente de BATIOUNI (2010) relata que os inibidores específicos de COX-2 inibem a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI-2, diminuindo assim a

excreção de sódio, o que pode levar a uma injúria renal aguda (GRANGEIRO, *et al.*, 2008). No presente trabalho, entretanto, não é possível afirmar que o uso do firocoxibe tenha provocado injúria renal aguda, já que os valores de creatinina não se elevaram e os de uréia, ainda que tenham aumentado significativamente após o tratamento, se mantiveram dentro da normalidade.

Dunn (2001) relata a possibilidade do aumento dos níveis séricos de uréia estar associado a perdas de sangue gastrintestinais. Este fato foi confirmado por Barbosa *et al.* (2010) em ratos tratados com diclofenaco por 14 dias, mas não foi observado após o uso de meloxicam e firocoxibe por 7 dias. Sangramentos gastrintestinais não foram observados ou relatados no presente trabalho. Assim, é necessário que o possível efeito do firocoxibe no trato gastrintestinal e na função renal sejam mais bem avaliados em experimentos específicos com maior número de animais e com o uso do medicamento por um período mais longo.

Os níveis de proteína plasmática total diminuíram significativamente entre os dois momentos no grupo tratado ($p=0,006$), embora tenham permanecido dentro dos parâmetros normais. Barbosa *et al.* (2010) não encontraram diferença nos níveis de proteína plasmática em ratos tratados com meloxicam e firocoxibe. No mesmo trabalho, os autores relatam que, com o uso de diclofenaco, ocorreu uma diminuição dos níveis de proteínas séricas, provavelmente devida também a perdas por hemorragias gastrintestinais. Segundo Dunn (2001), a diminuição de proteínas séricas por causas não hepáticas podem ocorrer em nefropatias e enteropatias perdedoras de proteínas. Hemorragias digestivas ocorreram em cães com idade superior estudados por Joubert, em 2009, quando tratados com firocoxibe por período de 90 dias.

Estes resultados dos níveis de uréia e proteínas totais sugerem que, embora não tenha sido confirmado com alterações clínicas, é possível que o uso do firocoxibe por 7 dias tenha causado algum grau de perda sanguínea, ainda que subclínica, nos animais utilizados neste experimento e, por isso, indica-se que os animais tratados com esse medicamento sejam monitorados criteriosamente, com avaliação da presença de sangue oculto nas fezes,

durante e após o tratamento.

Embora alguns animais tenham apresentado alterações importantes no tamanho dos tumores, não houve alterações significativas no volume do maior nódulo, contrariando a afirmação de Half *et al.* (2002); Millanta *et al.* (2006); Lavallo *et al.* (2009) e Ribeiro *et al.* (2009). E, embora não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os dois grupos, os valores encontrados no volume do maior nódulo sugerem uma tendência a aumento do volume dos tumores, mesmo nos animais tratados com Firocoxibe, ao contrário do que foi relatado por Basu *et al.* (2004), que ao estudar ratos transgênicos tratados com celocoxibe, evidenciou uma diminuição no peso médio dos tumores após o tratamento.

Um experimento de Ribeiro *et al.* (2009), avaliando 30 cadelas com tumores mamários, mostrou uma correlação positiva entre a malignidade do tumor e a expressão de COX-2, tanto em tumores mistos malignos como em carcinomas. No presente trabalho, entretanto, essa correlação não foi verificada, em concordância com os resultados apresentados por Costa *et al.* (2011).

O fato de o grupo controle ter apresentado um significativo aumento da expressão da COX-2 após o intervalo de 7 dias desde a biópsia incisional, pode indicar uma resposta inflamatória fisiológica normal em decorrência da agressão tecidual, mas pode também significar uma progressão da doença, como descreve Ribeiro *et al.* (2009). No grupo tratado, entretanto, esse aumento na expressão de COX-2 após a biópsia incisional não foi observado, o que demonstra que houve efeito do firocoxibe, evitando tal aumento no grupo tratado.

Alguns trabalhos sugerem que deva haver uma diminuição da expressão de COX-2 nos animais tratados com anti-inflamatórios (DUNN, 2001; ANDRADE, 2002; GRANGEIRO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; BATIOUNI, 2010), associada à diminuição da neovascularização e aumento na apoptose tumoral. Embora a diminuição da expressão de COX-2 no grupo tratado não tenha se confirmado nos animais tratados no presente trabalho, possivelmente em decorrência do pequeno número de animais, o fato de ter

havido aumento apenas nos animais do grupo controle pode indicar que o tratamento com firocoxibe possivelmente limite a evolução dos tumores de mama, conforme o relato recente de Tran-Thanh *et al.* (2010).

CONCLUSÕES

Nas condições em que foi realizado o presente trabalho, é possível concluir que:

- ✧ A biópsia incisional não é confiável para o estabelecimento de um diagnóstico prévio do tumor de mama em cadelas;
- ✧ Os tumores mamários em cadelas expressam a enzima cicloxigenase (COX-2), independentemente de sua classificação histopatológica e de seu tamanho;
- ✧ A realização de biópsia incisional prévia não provoca alterações clínicas ou nos parâmetros bioquímicos;
- ✧ O uso do firocoxibe por 7 dias provoca alterações sutis, embora significativas, nos níveis de uréia sérica e proteínas plasmáticas totais;
- ✧ O uso do firocoxibe por 7 dias consegue deter o aumento da expressão da enzima COX-2 em tumores de mama de cadelas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que o uso do firocoxibe pode ser benéfico como coadjuvante no tratamento de tumores de mama em cadelas, podendo contribuir para retardar a progressão da doença. Entretanto, como ainda não há estudos suficientes que garantam a segurança de seu uso por tempo prolongado em cadelas de idade avançada, como as que são geralmente acometidas por tumores de mama, acreditamos que, caso se opte por uso mais prolongado do fármaco, deva-se monitorar a função renal, por meio de urinálise e dosagem dos compostos nitrogenados séricos e presença de lesão no trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S.F. Antinflamatórios. In: _____ *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2002. p: 89-113.
- BARBOSA, C.M.; SAKATE, M.; CAMPLESI, A.C.; VAILATI, F.; MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K. Avaliações Hematológicas e Bioquímicas do Uso de Diclofenaco de Sódio, Meloxicam e Firocoxibe em Ratos. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v.47, n.2, p. 118-126, 2010.
- BASU, G.D.; PATHANGEY, L.B.; TINDER, T.L.; LAGIOIA, M.; GENDLER, S.J.; MUKHERJEE, P. Cyclooxygenase-2 Inhibitor Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells in an In vivo Model of Spontaneous Metastatic Breast Cancer, *Mol. Cancer. Res.*, v.2, n.11, p.632-642. 2004.
- BATIOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.94, n.4. 2010.
- BRUNE, K.; HINZ, B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: similarities and differences. *Scand J Rheumatol.*, v.33, p.1-6, 2004.
- BRUNELLE, M *et al.* Cyclooxygenase-2 Expression in Normal and Neoplastic Canine Mammary Cell Lines. *Veterinary Pathology*, v.43, p.656-666, 2006.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; [FERREIRA, E.](#); [BERTAGNOLLI, A.C.](#); [LIMA, A.E.S.](#); ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G. *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 4, p. 153-180, 2011.
- CASSALI, G.D., *Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 80f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAVALCANTI, M.F.; CASSALI, G.D. Fatores prognósticos no diagnóstico clínico e histopatológico dos tumores de mama em cadelas- revisão. *Clinica Veterinária*, Ano XI, n. 61, p. 56-64, 2006.

COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J.S.; LEITAO, D.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F.C. Cyclo-oxygenase 2 Expression is Associated with Angiogenesis and Lymph Node Metastasis in Human Breast Cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v.55,p.429-434, 2002.

COUTO,C.G. Principios Generales de Tratamiento em Pacientes Oncologicos. In: XXIII CONGRESO DE LA ASSOCIACION MUNDIAL DE MEDICINA VETERINARIA DE PEQUEÑOS ANIMALES. 1998, Buenos Aires. Resumen... Buenos Aires: WSAVA, 1998. v 1, p.103-104.

DALECK,C.R.; FRANCESCHINI,P.H.; ALESSI,A.C.; SANTANA, A.E.; MARTINS, M.I.M.; Aspectos Clínicos e Cirúrgicos do Tumor Mamário Canino. *.Ciência Rural*, v.28 (1), p 95-100, 1998.

DE NARDI, A.B.;DALECKC. R.; SOUZA, C. H. M; AMORIM, R. L.; RODASKI, S.; CALDERON, C.; TORRES, R. Cyclooxygenase-2 Expression in Mammary Tumors in Dogs and its Correlation to Histologic and Biologic Behavior. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.3 (1), p.56-57, 2005.

DORÉ, M., LANTHIER, I., SIROIS, J. Cyclooxygenases-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 207-212, 2003.

ANDRADE, S.F. Anti-inflamatórios. In:_____ *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2002. p:89-113.

DUNN, J.K. Doenças do Trato Alimentar; Doenças do Sistema Urinário. In:_____ *Tratado de Medicina de Pequenos Animais*. 1ª Ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 367-443; 607-689.

ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE RASTREAMENTO DE CÂNCER DE MAMA, 2009, Rio de Janeiro. Instituto Nacional do Câncer, 2009. Disponível em: (http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/palestras/cancer/cancer_mama_brasil.pdf).

FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; CAVALCANTI, M.F.; SCHMITT, F.C.; CASSALI, G.D. The relationship between tumour size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumours. *Vet. Comp. Oncol.*, v. 193, p. 1-6, 2009.

FOSSUM, T. W. Neoplasias Mamarias. In:_____ *Cirurgia de pequenos animais*.

1ªed. p São Paulo: Roca, 2001. p.596-601.

GALERA, P.D.; FREITAS, S.H.; OLIVEIRA, J.E.B.; GODOI, S.. Estudo retrospectivo da ocorrência de tumores de mama em cadelas. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v. 24 (6), p. 252-254, 2002.

GOMIDE, P.R.S.; BRANDÃO, C.V.S.; RANZANI, J.J.T.; RAHAL, S.C.; TEIXEIRA, C.R.; ROCHA, N.S. Estudo Retrospectivo de Cadelas Portadoras de Neoplasia Mamaria Submetidas à Mastectomia. (www.prope.unesp.br/xxi_cic/27_31782303863.pdf) (em 26/10/2012).

GRANGEIRO, N.M.G.C.; CHAVES, H.V.A.; SILVA, A.R.; GRAÇA, J.R.V.; LIMA, V.; BEZERRA, M.M. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2 : Inflamação e Gastro-Cardio Proteção. *Pesquisa Médica*, v. 2, n.3, p.13-20, 2008.

HALF, E.; TANG, X.M.; GWYN, K.; SAHIN, A.; WATHEN, K.; SINICROPE, F.A. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Breast Cancers and Adjacent Ductal Carcinoma *in situ*. *Cancer Research*, v. 62, p. 1676-1681, 2002.

HATORE, T.; MARQUES, D.; GUILLEM, C.; RUSSO, C. Incidência de Carcinoma nas Neoplasias Mamarias de Cadelas Atendidas no Hospital Veterinário da CESUMAR. In: IV ENCONTRO INTERNACIONAL DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA CESUMAR. 2011, Maringá. Disponível em: <http://bit.ly/ThD6lx>

HILARIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais:inibidores da ciclooxigenase 2. *Jornal de Pediatria*, v.82(5), suppl.0, 2006.

HOWE, L.R.; CHANG, S.H.; TOLLE, K.C.; DILLON, R.; YOUNG, L.J.; CARDIFF, R.D.; NEWMAN, R.A.; YANG, P.; THALER, H.T.; MULLER, W.J.; HUDIS, C.; BROWN, A.M.; HLA, T.; SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, A.J. HER2/neu-Induced mammary tumorigenesis and angiogenesis are reduced in cyclooxygenase-2 knockout mice, *Cancer Res.* v. 65 (21), p.10113-10119. 2005.

JOUBERT, K.E. The effects of firocoxib (Previcox) in geriatric dogs over a period of 90 days. *J. S. Afr. Vet. Ass.* v. 80 (3), p.179-184. 2009.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic*

Animals. 5^a ed. 1997. London: Academic Press. 932 p.

LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.L.; CASSALI, G.D. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary Pathology*, v.46, p. 1275-1280, 2009.

MARTINS, C.M.; FERREIRA, A.M.R. Marcadores prognósticos como auxílio à conduta clínico- cirúrgica em cadela apresentando múltiplos nódulos mamários. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, n. 3, p. 189-191, 2003.

MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. 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, p.115-120, 2006.

MISDORP, W. Tumors of the Mammary Gland. In: MEUTEN, D. J. *Tumors in Domestic Animals*. 4^{ed}. 2002. Iowa: Editora Iowa State Press, 2002, p. 575 - 606.

MORRISON, B.M. Canine and Feline Mammary Tumors. In: ____ *Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management*. 2 ed. 2002. Baltimore: William & Wilkins. p.565-573.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Neoplasia Mamaria: in: ____ *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 2^oed. 2001. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.686-688.

NOVOSAD, C.A. Principles of treatment for mammary gland tumors. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 18(2), p. 107-109, 2003.

OLIVEIRA, L.O.; OLIVEIRA, R.T.; LORETTI, A.P.; RODRIGUES, R.; DRIEMEIER, D. Aspectos Epidemiológicos da Neoplasia Mamária Canina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31(2), p 110-115, 2003.

OWEN, L. TNM classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, p.46-47, 1980.

PALERMO NETO, J. Prostaglandinas. In: ____ SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. *Farmacologia aplicada à Medicina veterinária*. 3^oed. 2002.

Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.212-223.

PESTILI DE ALMEIDA, E.; PICHE, C.; SIROIS, J.; DORE, M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 867-875., 2001.

QUEIROGA, F.L.; PIRES, I; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, v.88, p. 441–445, 2010.

RASSNICK, K.C. How I Treat Canine Mammary Gland Tumors. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2005. *Proceedings...* NAVC: Orlando, 2005. p.666-667.

RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; COSTA NETO, J.M.; D'ASSIS, M.J.M.H.; COSTA, A.T.; SILVA, N.S.; AGUIAR, P.H.P.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da Cox-2 nos Carcinomas Mamários de Cadelas. *Veterinária em Foco*. v.6, nº2, p134-140, 2009.

ROBERTSON, F.M.; MALLERY, S.R.; BERGDALL-COSTELL, V.K.; CHENG, M.; PEI, P.; PROSPERI, J.R.; FERRARI, M. Cyclooxygenase-2 Directly Induces MCF-7 Breast Tumors Cells to Develop into Exponentially Growing, Highly Angiogenic and Regionally Invasive Human Ductal Carcinoma Xenografts. *Anticancer Research*, v.27, p.719-728, 2007.

RYANS, W.G.; MOLDAVE, K.; CARITHERS, D. Switching NSAIDs in Practice: Insights from the Previcox (Firocoxib) Experience Trial. *Veterinary Therapeutics*, v.8, n.4, p. 263-271, 2007.

SOBIN, L.H.; FLEMING, I.D. TNM classification of malignant tumors, fifth edition. *Cancer*, v.80 (9), p.1803-1804, 1997.

SORENMO, K. Canine Mammary tumors. *Vet. Clin. North Am. Small Animal Pract.*, v. 33, p. 573-596, 2003.

STEAGALL, P.V.; MANTOVANI, F.B.; FERREIRA, T.H.; SALCEDO, E.S.; MOUTINHO, F.Q.; LUNA, S.P. Evaluation of the effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, v. 30, p. 218-223, 2007.

STRATMANN, N.; FAILING, K.; RICHTER, A.; WEHREND, A. Mammary Tumors Recurrence in Bitches After Regional Mastectomy. *Veterinary Surgery*, v.37, p.82-86, 2008.

TRAN-THANH, D.; BUTTARS, S.; WEN, Y.; WILSON, C.; DONE, S.J. Cyclooxygenase-2 Inhibition for the Prophylaxis and Treatment of Preinvasive Breast Cancer in a Her-2/Neu Mouse Model. *Cancer Prevention Research*, v.3, n.2, p. 202-211, 2010.

VALADÃO, M.L.C.R. *Dados clínicos, morfometria e textura nuclear como fatores prognósticos e preditivos no tumor venéreo Transmissível Canino*. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

WALDRON, D.R. Diagnosis and surgical management of mammary neoplasia in dogs and cats. *Veterinary Medicine*, v.96, n.12, p.943-948, 2001.

WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4ed. 2007. Missouri: Saunders; 2007. p. 401-475.

ZUCCARI, D.A.P.C.; SANTANA, A.E.; ROCHA, N.S.. Correlação entre Citologia Aspirativa por Agulha Fina e a Histologia no Diagnóstico de Tumores Mamários em Cadelas. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.38, nº1, p38-41. 2001.

ARTIGO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA CIÊNCIA RURAL**Avaliação clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em cadelas submetidas a tratamento com inibidor da cicloxigenase-2 (firocoxibe).**

(Clinical and immunohistochemical evaluation of mammary tumors in female dogs undergoing treatment with inhibitors of cyclooxygenase-2 (firocoxib).)

Resumo: Tumores mamários expressam a enzima cicloxigenase (Cox-2), que caracteriza um processo inflamatório intenso e pode também demonstrar a presença de alterações paraneoplásicas. Este trabalho teve por objetivo estudar a expressão de Cox-2 em tumores mamários de cadelas e avaliar o efeito do anti-inflamatório firocoxibe sobre a mesma. Os animais selecionados foram divididos em dois grupos: controle (9 animais) e tratado (10 animais). As cadelas foram avaliadas por exame clínico, bioquímica sérica, tamanho, volume, localização e avaliação TNM dos tumores e avaliação da qualidade de vida. O grupo tratado recebeu o firocoxibe na dosagem de 5mg/kg ao dia por sete dias e após este período todos os animais foram novamente avaliados e submetidos à mastectomia. As amostras obtidas nos dois momentos foram avaliadas por exame histológico e imunoistoquímica para expressão de Cox-2. Os resultados mostraram que, embora não tenha havido diferença no tamanho do maior nódulo ou na expressão de COX -2 entre os grupos após o tratamento, o aumento na expressão de COX-2 observado no grupo controle não foi verificado no grupo tratado e que os animais que receberam o tratamento por 7 dias apresentaram diminuição dos níveis de proteínas séricas totais ($p=0.00588$) e aumento dos níveis séricos de uréia ($p=0.01388$). Estes resultados sugerem que o uso do firocoxibe como coadjuvante no tratamento de cadelas com neoplasia mamária submetidas à mastectomia pode ser benéfico para deter a evolução da doença, embora seja indicado o acompanhamento dos animais para garantir que não haja sangramento gastrointestinal e que a saúde seja preservada.

Palavras chave: Oncologia, mama, cicloxigenase, firocoxibe, cães.

Abstract: Breast tumors express the enzyme cyclooxygenase (COX-2), characterizing an inflammatory process and also demonstrate the presence of paraneoplastic alterations. This experiment aimed to study the expression of Cox-2 in mammary tumors of dogs and to evaluate the effect of anti-inflammatory firocoxib on it. The selected animals were divided into two groups: control (9 animals) and treated (10 animals). The animals were evaluated by clinical examination, serum biochemistry, size, volume, location and TNM evaluation of tumors and assessment of quality of life. The treatment group received firocoxib at dosage of 5mg/kg daily for seven days and after this period all animals were re-evaluated and submitted to mastectomy. The samples obtained at both moments were evaluated by histology and immunohistochemistry for the expression of Cox-2. The results showed that, although there was no difference in size of the largest tumor or in the expression of COX-2 between the groups after treatment, increased expression of COX-2 seen in the control group was not observed in the treated group and that those animals that received firocoxib for 7 days showed decreased levels of total serum protein ($p = 0.00588$) and increased serum levels of urea ($p = 0.01388$). These results suggest that the use of firocoxib as adjuvant therapy for dogs with breast cancer submitted to mastectomy can be beneficial to halt the

progression of the disease, although monitoring of animals is indicated to ensure there is no gastrointestinal bleeding and health is preserved.

Keywords: Oncology, breast, cyclooxygenase, firocoxib, dogs.

Introdução: Os tumores de mama são as mais comuns das neoplasias caninas, totalizando cerca da metade dos tumores diagnosticados em cadelas. São raros em animais jovens, acometendo animais com idade média entre 9 e 11 anos (MORRIS, 2010; WITHROW, 2007). Segundo CASSALI (2000), os tumores mamários espontâneos caninos apresentam muitas semelhanças com os da espécie humana e são passíveis de serem utilizados como modelo experimental para estudos comparativos com a espécie humana. Assim sendo, podemos inferir que a identificação de ferramentas que possam auxiliar no prognóstico dos tumores mamários possibilitará a escolha de tratamentos mais adequados para o controle da doença, possivelmente beneficiando a ambas as espécies.

Estudos imunoistoquímicos têm revelado a expressão das enzimas cicloxigenases (Cox) em diversos tecidos. Tais enzimas são responsáveis pela síntese de prostaglandinas, e possuem várias isoformas. A Cox-1 tem sido relatada em quase todos os tecidos de forma fisiológica, enquanto Cox-2 se expressa geralmente induzida por algum processo patológico nos tecidos (PESTILI DE ALMEIDA *et al.*, 2001), tais como carcinomas mamários (QUEIROGA *et al.*, 2010; De NARDI *et al.*, 2005), carcinomas intestinais (LAVALLE *et al.*, 2009) e carcinomas espinocelulares de cães (PESTILI DE ALMEIDA *et al.*, 2001).

O primeiro estudo relacionando COX-2 a neoplasias mamárias em cadelas foi realizado por DORÉ *et al.*, (2003), os quais não encontraram expressão desta enzima em mamas normais e observaram sua expressão aumentada nos adenomas e adenocarcinomas mamários. Segundo LAVALLE *et al.* (2009), existe uma correlação entre uma grande expressão de COX-2 com o aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, diminuição da apoptose e formação de novos vasos, indicando um pior prognóstico (RIBEIRO *et al.*, 2009). Outros autores, por sua vez, observaram que mais de 50% dos tumores de glândula mamária apresentaram sobre-expressão de COX-2 e, desta forma, sugeriram que as drogas inibidoras desta enzima possam ser úteis em uma terapia multimodal (RASSNICK, 2005).

De acordo com LAVALLE *et al.*, (2009), a prostaglandina E₂ (PGE₂), produto catalítico da COX-2, altera os mecanismos da apoptose, diminuindo sua indução nos tecidos. Outro estudo demonstrou por exame imunoistoquímico que não há expressão de COX-2 em glândulas mamárias sadias, porém há baixa expressão nos adenomas e grande expressão nos adenocarcinomas, o que reforça a possível associação direta entre malignidade do tumor e a expressão de COX-2 (HALF *et al.*, 2002), embora alguns autores acreditem não haver relação entre a expressão de COX-2 e a evolução tumoral (COSTA *et al.*, 2011).

Alguns trabalhos indicam que a expressão de COX-2 em neoplasias mamárias corresponde a uma menor expectativa de vida, ou seja, um pior prognóstico e que animais com baixa densidade vascular e com baixa expressão de COX-2 apresentam sobrevivência significativamente mais prolongada (MILLANTA *et al.*, 2006; LAVALLE *et al.*, 2009). Outros autores relatam um decréscimo da expressão das prostaglandinas frente à inibição das COX-2 em estudos *in vitro* em culturas celulares (BRUNELLE *et al.*, 2006).

A partir dessas observações, sugere-se que o tratamento com drogas inibidoras das COX-2 (anti-inflamatórios não esteroidais) possa ser uma boa estratégia para prevenção e tratamento das neoplasias mamárias em cadelas (MILLANTA *et al.*, 2006; HALF *et al.*, 2002; LAVALLE *et al.*, 2009).

Os inibidores seletivos de COX-2 (Coxibes) exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, como o aumento de risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial. Estes riscos são maiores em pacientes humanos com histórico de doenças correlacionadas (BATIOUNI, 2010). Esses fármacos possuem eficácia analgésica e anti-inflamatória, porém com tolerabilidade superior. A inibição específica de COX-2 bloqueia a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI₂, diminuindo a excreção de sódio, acarretando edema e elevação da pressão sanguínea. Além disso, a sua inibição altera o equilíbrio entre o tromboxano A₂ (TXA₂), derivado das plaquetas, e a prostaglandina (PGI₂) derivada do endotélio, aumentando o risco de trombozes e infartos, devendo-se ter uma avaliação criteriosa na escolha da terapia entre os anti-inflamatórios não esteroidais (Aines) e os Coxibes (GRANGEIRO, *et al.*, 2008).

Um estudo realizado em camundongos transgênicos Her-2/neu com carcinoma ductal *in situ*, não demonstrou prevenção ou controle do crescimento tumoral, bem como de metástases, em animais tratados com Celecoxibe. No entanto, a droga teve como efeito a diminuição na expressão do fator de crescimento vascular (VEGF), apontado como principal fator angiogênico das neoplasias mamárias (TRAN-THANH *et al.*, 2010).

Em contrapartida, em estudo semelhante realizado por Basu *et al.* (2004) com a mesma droga (celecoxibe), também em camundongos transgênicos, observou-se redução significativa no peso do tumor mamário associado à apoptose e diminuição da proliferação celular *in vivo*. A diminuição da proliferação celular está correlacionada com a diminuição da ativação da proteína quinase B/Akt, cujo aumento leva a maior sobrevivência celular, com expressão aumentada da proteína pro-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

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

Entretanto, a administração do mesmo fármaco por noventa dias para cães idosos (idade superior a 7 anos) acarretou em alguns efeitos colaterais, tais como: diarreia, vômitos, fezes escuras e anorexia discreta (JOUBERT, 2009).

Com base no exposto, este trabalho tem por objetivos estudar a expressão de Cox-2 em carcinomas mamários ductais de cadelas, avaliar o efeito do firocoxibe sobre a expressão de Cox-2 nos tumores mamários em cadelas e avaliar os efeitos do uso do firocoxibe nos parâmetros clínicos e laboratoriais em cadelas com tumor de mama.

Material e Métodos: Foram selecionadas 19 fêmeas caninas com diagnóstico de neoplasia mamária atendidas no Centro Veterinário do curso de Medicina Veterinária da Universidade PUC Minas *campus* Poços de Caldas. Os animais foram triados pelo atendimento ambulatorial da universidade durante o período

de setembro de 2011 a agosto de 2012 e foram incluídos no trabalho apenas os animais sem doenças concomitantes ou uso prévio recente de medicamentos.

Todos os animais tiveram os nódulos dos tumores mamários mensurados com paquímetro, mapeados quanto à localização dos crescimentos, ao antímero e mama acometida (mamas inguinais, abdominais caudais e craniais, torácicas caudais e craniais) bem como avaliação de possível envolvimento dos linfonodos regionais palpáveis.

Realizaram-se exames radiográficos de tórax, com exposição látero-lateral e ventro-dorsal com o intuito de pesquisar presença de possíveis metástases pulmonares.

Os animais foram divididos em dois grupos, sendo o controle com 09 animais e o grupo tratado com 10 animais.

No primeiro dia experimental (D0), os animais de ambos os grupos foram avaliados e submetidos a colheita de sangue para exames laboratoriais e colheita de biópsia incisional dos tumores. No período de 7 dias (D0 a D6) a partir deste primeiro momento, os animais do grupo controle não foram submetidos a nenhum tratamento e os animais do grupo tratado receberam 5mg/Kg/dia de Firocoxibe (Previcox®) SID, por via oral.

Ao final deste período de 07 dias (D7), os animais de ambos os grupos retornaram para a realização da cirurgia, colheita de sangue e colheita da biópsia excisional. A opção entre mastectomia em bloco ou radical foi feita de acordo com o estadiamento clínico, segundo Owens (1980).

Para a colheita das amostras por biópsia incisional, os animais foram anestesiados com acepromazina 0,1mg/Kg e a meperidina 2,0mg/Kg, por via intramuscular, seguida de infusão de propofol a 5mg/Kg IV e redosagens em *bolus* quando o animal apresentava sinais de superficialização. Para os procedimentos de mastectomia, os animais receberam o mesmo protocolo pré-anestésico, seguido de indução anestésica com propofol 5mg/Kg IV e manutenção com anestesia inalatória com mistura gasosa de O₂ puro e isoflurano ao efeito.

Os fragmentos obtidos por biópsia incisional e excisional foram imediatamente fixados em solução de formalina neutra tamponada a 10 % e encaminhados ao laboratório de histopatologia para processamento, segundo as técnicas rotineiras para inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.

O método de imunoistoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB). Os cortes devidamente preparados foram incubados com o anticorpo primário anti-COX2 (CX-294, Dako, Carpinteria, CA, USA) na diluição de 1:50 e foram contracolorados com hematoxilina Harrys. Carcinomas sabidamente positivos para COX-2 foram empregados como controle positivo. Para controle negativo as amostras receberam tratamento com o *Universal Negative Control Mouse* (Dako, Carpinteria, USA).

As amostras de neoplasias mamárias foram histologicamente classificadas sob microscopia óptica de luz, segundo o *Consensus* para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento para Tumores Mamários Caninos (CASSALI *et al.*, 2011) e agrupadas para fins estatísticos em: Carcinoma em tumor misto (1); Carcinoma (2) e, Tumor misto benigno (3).

As lâminas de imunoistoquímica foram avaliadas sob microscopia óptica

de luz e graduadas em: sem expressão de COX2 (-), baixa expressão (+), moderada expressão (++) e intensa expressão (+++).

Em ambos os momentos experimentais (D0 e D7) foram colhidas amostras de sangue via punção venosa, em frascos estéreis com e sem EDTA, para realização de hemograma e exames bioquímicos séricos (ureia, creatinina, AST, ALT e proteína plasmática total). Tais amostras foram remetidas, imediatamente após o procedimento cirúrgico, ao laboratório de análises clínicas, onde foram processadas pelos métodos rotineiros.

Para comparação dos parâmetros volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e níveis séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT e proteínas totais (PT) entre os grupos nos dois momentos experimentais foi feita análise de variância (ANOVA) e, nos casos em que foi verificada diferença significativa, as médias foram submetidas ao teste de Tukey para avaliar a interação entre os fatores. O teste t de Student para amostras pareadas foi utilizado para comparação, em média, do efeito do momento experimental (D0 e D7) sobre os parâmetros avaliados em cada grupo. As proporções de cada tipo de classificação dos tumores nos dois momentos experimentais em cada grupo foram comparadas pelo teste de McNeimar para amostras pareadas. Para todas as análises estatísticas foi adotado o nível de 5% de significância.

Resultados: Os resultados da análise estatística dos dados obtidos nas avaliações dos tumores (volume do maior nódulo e expressão de COX-2) e nas avaliações laboratoriais das amostras de soro sanguíneo - uréia, creatinina, AST, ALT, proteínas totais - estão apresentados na Tabela 1.

Todos os resultados dos parâmetros laboratoriais obtidos no presente trabalho se apresentaram dentro da faixa de normalidade para espécie, segundo os padrões de KANEKO *et al.* (1997), em concordância com os resultados descritos por STEAGALL *et al.* (2007). Contudo, alguns dos parâmetros bioquímicos sofreram alterações significativas durante o experimento.

A enzima alanina transaminase (ALT), que indica lesão dos hepatócitos (DUNN, 2001; ANDRADE, 2002), diminuiu significativamente nos animais do grupo controle no segundo momento de avaliação ($p=0,33$). Os valores do primeiro momento de avaliação no grupo controle foram também significativamente maiores que aqueles encontrados no grupo tratado neste mesmo momento ($p=0,019$). Possivelmente este resultado seja devido a alguns animais terem apresentado valor discrepante na primeira coleta, ainda que dentro dos limites de normalidade para a espécie. Como a meia vida desta enzima é de apenas poucas horas após alguma lesão hepática (ANDRADE, 2002), não se pode caracterizar uma continuidade da lesão.

Os níveis séricos de uréia no grupo tratado foram, em média, maiores no segundo momento de avaliação, em contradição aos resultados obtidos por STEAGALL *et al.* (2007), que avaliaram cães saudáveis tratados com firocoxibe e não encontraram tal alteração. Entretanto, um estudo recente de BATIOUNI (2010) relata que os inibidores específicos de COX-2 inibem a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI-2, diminuindo assim a excreção de sódio, o que pode levar a uma injúria renal aguda (GRANGEIRO, *et al.*, 2008). No presente trabalho, entretanto, não é possível afirmar que o uso do firocoxibe tenha provocado injúria renal aguda, já que os valores de creatinina não se elevaram e os de uréia, ainda que tenham aumentado significativamente após

o tratamento, se mantiveram dentro da normalidade.

Dunn (2001) relata a possibilidade do aumento dos níveis séricos de uréia estar associado a perdas de sangue gastrintestinais. Este fato foi confirmado por Barbosa *et al.* (2010) em ratos tratados com diclofenaco por 14 dias, mas não foi observado após o uso de meloxicam e firocoxibe por 7 dias. Sangramentos gastrintestinais não foram observados ou relatados no presente trabalho. Assim, é necessário que o possível efeito do firocoxibe no trato gastrintestinal e na função renal sejam mais bem avaliados em experimentos específicos com maior número de animais e com o uso do medicamento por um período mais longo.

Os níveis de proteína plasmática total diminuíram significativamente entre os dois momentos no grupo tratado ($p=0,006$), embora tenham permanecido dentro dos parâmetros normais. Barbosa *et al.* (2010) não encontraram diferença nos níveis de proteína plasmática em ratos tratados com meloxicam e firocoxibe. No mesmo trabalho, os autores relatam que, com o uso de diclofenaco, ocorreu uma diminuição dos níveis de proteínas séricas, provavelmente devida também a perdas por hemorragias gastrintestinais. Segundo Dunn (2001), a diminuição de proteínas séricas por causas não hepáticas podem ocorrer em nefropatias e enteropatias perdedoras de proteínas. Hemorragias digestivas ocorreram em cães com idade superior estudados por Joubert, em 2009, quando tratados com firocoxibe por período de 90 dias.

Estes resultados dos níveis de uréia e proteínas totais sugerem que, embora não tenha sido confirmado com alterações clínicas, é possível que o uso do firocoxibe por 7 dias tenha causado algum grau de perda sanguínea, ainda que subclínica, nos animais utilizados neste experimento e, por isso, indica-se que os animais tratados com esse medicamento sejam monitorados criteriosamente, com avaliação da presença de sangue oculto nas fezes, durante e após o tratamento.

Embora alguns animais tenham apresentado alterações importantes no tamanho dos tumores, não houve alterações significativas no volume do maior nódulo, contrariando a afirmação de Half *et al.* (2002); MILLANTA *et al.* (2006); LAVALLE *et al.* (2009) e RIBEIRO *et al.* (2009). E, embora não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os dois grupos, os valores encontrados no volume do maior nódulo sugerem uma tendência a aumento do volume dos tumores, mesmo nos animais tratados com Firocoxibe, ao contrário do que foi relatado por Basu *et al.* (2004), que ao estudar ratos transgênicos tratados com celocoxibe, evidenciou uma diminuição no peso médio dos tumores após o tratamento.

Um experimento de RIBEIRO *et al.* (2009), avaliando 30 cadelas com tumores mamários, mostrou uma correlação positiva entre a malignidade do tumor e a expressão de COX-2, tanto em tumores mistos malignos como em carcinomas. No presente trabalho, entretanto, essa correlação não foi verificada, em concordância com os resultados apresentados por Costa *et al.* (2011).

O fato do grupo controle ter apresentado um significativo aumento da expressão da COX-2 após o intervalo de 7 dias desde a biópsia incisional, pode indicar uma resposta inflamatória fisiológica normal em decorrência da agressão tecidual, mas pode também significar uma progressão da doença, como descreve RIBEIRO *et al.* (2009). No grupo tratado, entretanto, esse

aumento na expressão de COX-2 após a biópsia incisional não foi observado, o que demonstra que houve efeito do firocoxibe, evitando tal aumento no grupo tratado.

Alguns trabalhos sugerem que deva haver uma diminuição da expressão de COX-2 nos animais tratados com anti-inflamatórios (DUNN, 2001; ANDRADE, 2002; GRANGEIRO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; BATIOUNI, 2010), associada à diminuição da neovascularização e aumento na apoptose tumoral. Embora a diminuição da expressão de COX-2 no grupo tratado não tenha se confirmado nos animais tratados no presente trabalho, possivelmente em decorrência do pequeno número de animais, o fato de ter havido aumento apenas nos animais do grupo controle pode indicar que o tratamento com firocoxibe possivelmente limite a evolução dos tumores de mama, conforme o relato recente de TRAN-THANH *et al.* (2010).

Este trabalho mostrou que o uso do firocoxibe pode ser benéfico como coadjuvante no tratamento de tumores de mama em cadelas, podendo contribuir para frear a progressão da doença. Entretanto, como ainda não há estudos suficientes que garantam a segurança de seu uso por tempo prolongado em cadelas de idade avançada, como as que são geralmente acometidas por tumores de mama, acreditamos que, caso se opte por uso mais prolongado da droga, deva-se monitorar a função renal, por meio de urinálise e dosagem dos compostos nitrogenados séricos.

Referências:

- ANDRADE, S.F. Anti-inflamatórios. In: _____ *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2ª Ed. São Paulo: Roca, 2002. p:89-113.
- BARBOSA, C.M.; SAKATE, M.; CAMPLES, A.C.; VAILATI, F.; MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K. Avaliações Hematológicas e Bioquímicas do Uso de Diclofenaco de Sódio, Meloxicam e Firocoxibe em Ratos. *Braz. J. Vet. Anim. Sci.*, v.47, n.2, p. 118-126, 2010.
- BASU, G.D.; PATHANGEY, L.B.; TINDER, T.L.; LAGIOIA, M.; GENDLER, S.J.; MUKHERJEE, P. Cyclooxygenase-2 Inhibitor Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells in an In vivo Model of Spontaneous Metastatic Breast Cancer, *Mol. Cancer. Res.*, v.2, n.11, p.632-642. 2004.
- BATIOUNI, M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.94, n.4. 2010.
- BRUNELLE, M *et al.* Cyclooxygenase-2 Expression in Normal and Neoplastic Canine Mammary Cell Lines. *Veterinary Pathology*, v.43, p.656-666, 2006.
- CASSALI, G.D.; LAVALLE, G.E.; DE NARDI, A.B.; FERREIRA, E.; BERTAGNOLLI, A.C.; LIMA, A.E.S.; ALESSI, A.C.; DALECK, C.R.; SALGADO, B.S.; FERNANDES, C.G. *et al.* Consensus for the Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Mammary Tumors. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v. 4, p. 153-180, 2011.
- CASSALI, G.D., *Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – Aspectos comparativos com neoplasias da mama humana*. 2000. 80f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COSTA, C.; SOARES, R.; REIS-FILHO, J.S.; LEITAO, D.; AMENDOEIRA, I.; SCHMITT, F.C. Cyclo-oxygenase 2 Expression is Associated with Angiogenesis and Lymph Node Metastasis in Human Breast Cancer. *Journal of Clinical Pathology*, v.55, p.429-434, 2002.
- DE NARDI, A.B.; DALECK, C.R.; SOUZA, C. H. M; AMORIM, R. L.; RODASKI,

- S.; CALDERON, C.; TORRES, R. Cyclooxygenase -2 Expression in Mammary Tumors in Dogs and its Correlation to Histologic and Biologic Behavior. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.3 (1), p.56-57, 2005.
- DORÉ, M., LANTHIER, I., SIROIS, J. Cyclooxygenases-2 Expression in Canine Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 207-212, 2003.
- DUNN, J.K. Doenças do Trato Alimentar; Doenças do Sistema Urinário. In: _____. *Tratado de Medicina de Pequenos Animais*. 1ª Ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 367-443; 607-689.
- GRANGEIRO, N.M.G.C.; CHAVES, H.V.A.; SILVA, A.R.; GRAÇA, J.R.V.; LIMA, V.; BEZERRA, M.M. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2 : Inflamação e Gastro-Cardio Proteção. *Pesquisa Médica*, v. 2, n.3, p.13-20, 2008.
- HALF, E.; TANG, X.M.; GWYN, K.; SAHIN, A.; WATHEN, K.; SINICROPE, F.A. OWEN, L. TNM classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, p.46-47, 1980.
- PESTILI DE ALMEIDA, E.; PICHE, C.; SIROIS, J.; DORE, M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 867-875., 2001.
- QUEIROGA, F.L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, v.88, p. 441–445, 2010.
- RASSNICK, K.C. How I Treat Canine Mammary Gland Tumors. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2005. *Proceedings...* NAVC: Orlando, 2005. p.666-667.
- RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; COSTA NETO, J.M.; D'ASSIS, M.J.M.H.; COSTA, A.T.; SILVA, N.S.; AGUIAR, P.H.P.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da Cox-2 nos Carcinomas Mamários de Cadelas. *Veterinária em Foco*. v.6, nº2, p134-140, 2009.
- STEAGALL, P.V.; MANTOVANI, F.B.; FERREIRA, T.H.; SALCEDO, E.S.; MOUTINHO, F.Q.; LUNA, S.P. Evaluation of the effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, v. 30, p. 218-223, 2007.
- TRAN-THANH, D.; BUTTARS, S.; WEN, Y.; WILSON, C.; DONE, S.J. Cyclooxygenase-2 Inhibition for the Prophylaxis and Treatment of Preinvasive Breast Cancer in a Her-2/Neu Mouse Model. *Cancer Prevention Research*, v.3, n.2, p. 202-211, 2010.
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology. 4ed. 2007. Missouri: Saunders; 2007. p. 401-475. Cyclooxygenase-2 Expression in Human Breast Cancers and Adjacent Ductal Carcinoma *in situ*. *Cancer Research*, v. 62, p. 1676-1681, 2002.
- JOUBERT, K.E. The effects of firocoxib (Previcox) in geriatric dogs over a period of 90 days. *J. S. Afr. Vet. Ass.* v. 80 (3), p.179-184. 2009.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5ª ed. 1997. London: Academic Press. 932 p.
- LAVALLE, G.E.; BERTAGNOLLI, A.C.; TAVARES, W.L.; CASSALI, G.D. Cox-2 Expression in Canine Mammary Carcinomas: Correlation with Angiogenesis and Overall Survival. *Veterinary prognosis of dogs with malignant mammary tumours. Res. Vet. Sci.*, v.88, p. 441–445, 2010.
- RASSNICK, K.C. How I Treat Canine Mammary Gland Tumors. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2005. *Proceedings...* NAVC: Orlando, 2005. p.666-667.

- RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; COSTA NETO, J.M.; D'ASSIS, M.J.M.H.; COSTA, A.T.; SILVA, N.S.; AGUIAR, P.H.P.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da Cox-2 nos Carcinomas Mamários de Cadelas. *Veterinária em Foco*. v.6, nº2, p134-140, 2009.
- STEAGALL, P.V.; MANTOVANI, F.B.; FERREIRA, T.H.; SALCEDO, E.S.; MOUTINHO, F.Q.; LUNA, S.P. Evaluation of the effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, v. 30, p. 218-223, 2007.
- TRAN-THANH, D.; BUTTARS, S.; WEN, Y.; WILSON, C.; DONE, S.J. Cyclooxygenase-2 Inhibition for the Prophylaxis and Treatment of Preinvasive Breast Cancer in a Her-2/Neu Mouse Model. *Cancer Prevention Research*, v.3, n.2, p. 202-211, 2010.
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4ed. 2007. Missouri: Saunders; 2007. p. 401-475.
- MILLANTA, F.; CITI, S.; DELLA SANTA, D.; PORCIANI, M.; POLI, A. 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, p.115-120, 2006.
- OWEN, L. TNM classification of tumors in domestic animals. *World Health Organization*, p.46-47, 1980.
- PESTILI DE ALMEIDA, E.; PICHE, C.; SIROIS, J.; DORE, M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J. Histochemistry and Cytochemistry*, 49, 867-875., 2001.
- QUEIROGA, F.L.; PIRES, I.; LOBO, L.; LOPES, C.S. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res. Vet. Sci.*, v.88, p. 441-445, 2010.
- RASSNICK, K.C. How I Treat Canine Mammary Gland Tumors. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2005. *Proceedings...* NAVC: Orlando, 2005. p.666-667.
- RIBEIRO, L.G.R.; DAMASCENO, K.A.; COSTA NETO, J.M.; D'ASSIS, M.J.M.H.; COSTA, A.T.; SILVA, N.S.; AGUIAR, P.H.P.; CASSALI, G.D.; ESTRELA-LIMA, A. Expressão da Cox-2 nos Carcinomas Mamários de Cadelas. *Veterinária em Foco*. v.6, nº2, p134-140, 2009.
- STEAGALL, P.V.; MANTOVANI, F.B.; FERREIRA, T.H.; SALCEDO, E.S.; MOUTINHO, F.Q.; LUNA, S.P. Evaluation of the effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J. Vet. Pharmacol. Therapy*, v. 30, p. 218-223, 2007.
- TRAN-THANH, D.; BUTTARS, S.; WEN, Y.; WILSON, C.; DONE, S.J. Cyclooxygenase-2 Inhibition for the Prophylaxis and Treatment of Preinvasive Breast Cancer in a Her-2/Neu Mouse Model. *Cancer Prevention Research*, v.3, n.2, p. 202-211, 2010.
- WITHROW, S.J.; VAIL, D.M. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: *Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. 4ed. 2007. Missouri: Saunders; 2007. p. 401-475.

TABELA 1. Médias e desvio padrão (DP) dos parâmetros volume do maior nódulo (VMN), expressão de COX-2 (COX2) e níveis séricos de uréia (UR), creatinina (CRE), AST, ALT e proteínas totais (PT) nas cadelas estudadas nos grupos controle e tratado nos dois momentos experimentais (D0 e D7).

Grupo		VMN		COX2		UR		CRE		AST		ALT		PT	
		(cm)		(0-3)		(mg/dL)		(mg/dL)		(UI/L)		(UI/L)		(g/dL)	
		D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7
Control e (n=9)	Média	27.5 4	28.69	0.67	1.11	44.22	40.44	0.9	0.95	13.55	13.44	26.44	22.22	6.87	6.69
				a	b							A, a	b		
	DP	27.53	28.49	0.5	0.78	11.14	4.75	0.245	0.3087	3.71	3.1667	9.66	10.53	1.28	1.51
Tratado o (n=10)	Média	12.51	14.0	1.0	0.7	34.6	46.8	0.95	1.03	15.5	17.2	16.1	20.3	6.72	5.92
						a	b					B		a	b
	DP	11.62	14.71	0.67	0.95	14.00	18.28	0.52	0.51	6.43	12.38	7.79	9.52	1.23	1.02

Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os momentos de avaliação no mesmo grupo.

Para cada parâmetro avaliado, médias seguidas de letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.