

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO de COX-2 EM  
CARCINOMAS INTESTINAIS CANINOS**

**Fernanda Faquim dos Santos  
Médica Veterinária**

**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO de COX-2 EM  
CARCINOMAS INTESTINAIS CANINOS**

Fernanda Faquim dos Santos

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Castro Moraes  
**Coorientadores:** Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia  
Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

**2018**

Santos, Fernanda Faquim dos

S231 a Avaliação da Imunomarcção de COX-2 em Carcinomas Intestinais Caninos / Fernanda Faquim dos Santos. -- Jaboticabal, 2017

xii, 34 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Paola Castro Morais

Coorientador: Sérgio Britto Garcia

Banca examinadora: Pâmela Rodrigues Reina Moreira, Annelise Carla Camplesi

Bibliografia

1. Cães. 2. Células Caliciformes. 3. Intestino. 4. Neoplasia. 5. PAS. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-0006.6:636.7



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO de COX-2 EM CARCINOMAS  
INTESTINAIS CANINOS

**AUTORA: FERNANDA FAQUIM DOS SANTOS**

**ORIENTADORA: PAOLA CASTRO MORAES**

**COORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA  
VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profª. Dra. PAOLA CASTRO MORAES  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV/UNESP - Jaboticabal

Profª. Dra. ANNELESE CARLA CAMPLESI DOS SANTOS  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profª. Dra. PAMELA RODRIGUES REINA MOREIRA  
UNIRP / UNIVERSIDADE DE RIO PRETO

Jaboticabal, 07 de maio de 2018

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**FERNANDA F. DOS SANTOS** – nasceu em 17 de fevereiro de 1982, na cidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Graduiu-se pelo Centro Universitário Barão de Mauá-Ribeirão Preto-SP, em dezembro de 2007. Participou do Programa de Residência Médica na área de cirurgia geral, na mesma instituição até dezembro de 2009. Especializou-se em Diagnóstico por Imagem no Instituto Veterinário de Imagem (IVI-SP), no ano de 2011. Atualmente, é aluna regular do Programa de Mestrado em Cirurgia Veterinária da FCAV-UNESP- Jaboticabal, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Castro Moraes.

“Quando me tiraram o chão, eu descobri que tinha asas!”

## **AGRADECIMENTOS**

A minha querida mãe Aparecida, que nunca mediu esforços para me ajudar no que fosse necessário, e sempre, “SEMPRE” esteve ao meu lado.

A meu esposo Richard, companheiro de jornada, compreensivo e paciente.

Ao meu grande amor, LYON, que me ensinou tudo o que é preciso saber sobre amor e lealdade.

A minha querida professora e orientadora Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Paola Castro Moraes, que sempre foi um exemplo, obrigado por acreditar e a confiar em mim mesmo quando tudo parecia incerto.

Ao Prof<sup>o</sup>.Dr<sup>o</sup>. Sérgio Britto Garcia por ter aberto as portas do Departamento de Patologia - USP, e contribuído de forma ímpar para a elaboração desse projeto, transferindo-nos um pouco de seu conhecimento. Obrigado por seu apoio e dedicação!

Ao Prof<sup>o</sup>.Dr<sup>o</sup>. Andriago Barbosa de Nardi, obrigado pela confiança e tantos ensinamentos.

A Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Pâmela Rodrigues Reina Moreira, não tenho palavras para expressar minha gratidão, muito obrigado pela dedicação, apoio, carinho e amizade.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Annelise Carla Camplesi, por ter enriquecido ainda mais esse trabalho.

Aos médicos veterinários João Luiz Camacho e Gisele Garcia de Figueiredo Camacho, por acreditarem na minha capacidade e terem colaborado comigo no início dessa jornada.

Aos médicos veterinários e amigos Sandra Bernal Nicolau e Matheus Torres Maniero, por serem tolerantes e pacientes, por toda amizade e incentivo.

A todos aqueles queridos que conheci no HVET e que tornaram meus dias mais suaves, Anésia, Sr.Lauro, 600, Chevet's, Cinthia, Mônica, Gui, Carlos, Bel, Fabiana, Thiago Prada, Jorge, Vanessa, Mônica Horr, Rodrigo, Thuanny, Fabrícia, Juliana, Mariana, Danielle, meu muito obrigado.

Aos meus amigos, e familiares que sempre me incentivaram e por vezes me encorajaram para que eu seguisse rumo ao meu objetivo. Em especial, a minha irmã Daniela, Giovanna e Jéssica, que sempre me socorreram de alguma forma, levarei vocês sempre comigo onde eu estiver!

E primordialmente, agradeço a DEUS, pela oportunidade e acesso a educação, por ter me fornecido tudo o que eu precisava para concluir mais essa etapa. E principalmente, por ter me dado forças quando por várias vezes eu pensei em desistir!

A todos minha eterna gratidão, carinho e respeito!

## SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS Unesp.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Aspectos Éticos.....	13
4.2 Grupos Experimentais.....	13
4.3 Coleta das amostras.....	13
4.4 Avaliações histopatológicas.....	14
4.4.1 Grupo Neoplásico (GN).....	14
4.4.2 Grupo Saudável (GS).....	14
4.5 Análise Histopatológica e Histoquímica.....	14
4.6 Análise Imunohistoquímica.....	15
4.7 Análise Estatística.....	16
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1 Pacientes.....	17
6. CONCLUSÃO.....	25
7. REFERÊNCIAS.....	26

## CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UNESP

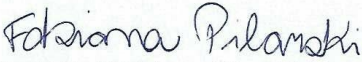


### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado "Avaliação da imunomarcção proteica de COX-2 e Ki-67 em carcinomas intestinais caninos", sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paola Castro Moraes e Certificado CEUA protocolo nº 14.420/16, aprovado em reunião ordinária em 18 de agosto de 2016, teve o título alterado para "Avaliação da imunomarcção de COX-2 em carcinomas intestinais caninos" com aprovação da alteração em reunião ordinária de 19 de abril de 2018.

Jaboticabal, 19 de abril de 2018.

  
**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fabiana Pilarski**  
Coordenadora - CEUA

## LISTA DE ABREVIATURAS

AINE's	Anti-inflamatórios não estereoidais
COX 2	Cicloxygenase 2
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
GS	Grupo Saudável
GN	Grupo Neoplásico
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos
HE	Hematoxilina Eosina
IL1	Interleucina 1
PAS	Periodic Acidific Schiff
PGFs	Prostaglandinas
TNF	Fator de Crescimento Tumoral

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Pacientes pertencentes ao grupo neoplásico (GN) com diagnóstico histopatológico de neoplasia intestinal. Jaboticabal, 2017.....17

**Tabela 2.** Pacientes pertencentes ao grupo saudável (GS). Jaboticabal, 2017.....17

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Fotomicrografia das amostras de intestino. (A) Nota-se em animais saudáveis, a presença acentuada de células caliciformes (setas) presente no epitélio glandular. (B) Observa-se em animais neoplásicos um predomínio de conteúdo positivo ao PAS no interior das glândulas (*) e de forma discreta a moderada no epitélio (seta). Ácido periódico de Schiff (PAS), Objetiva 40x.	20
<b>Figura 2.</b> Fotomicrografia das amostras de intestino. (A) Nota-se em animais saudáveis a imunomarcção granular intracitoplasmática de forma focal e discreta do anticorpo anti-COX2 (seta). (B) Observa-se animais neoplásicos a imunomarcção de membrana celular e citoplasmática de forma acentuada e difusa no epitélio glandular (seta preta), nas áreas císticas da neoplasia (cabeça de seta preta) e no infiltrado inflamatório mononuclear em região de estroma tumoral (seta vermelha). Complexo de Polímero Ligado a Peroxidase, Objetiva 40x.	21
<b>Figura 3.</b> Média das variáveis observadas nos animais saudáveis (A) e doentes (B). Notar a diferença significativa entre as variáveis em cada grupo Testes não paramétricos de Friedman e de Dunn. PAS=Ácido Periódico de Schiff; COX-2 GND = glândula não dilatada; COX-2 GC = glândulas císticas; COX-2 E = estroma periglandular	22
<b>Figura 4.</b> Comparação da média de cada variável entre os grupos. Detecção de células caliciformes pela coloração histoquímica de PAS (A) e Imunomarcção de células positivas para COX-2 em GND (B), Imunomarcção de células positivas para COX-2 em GC (C) e Imunomarcção de células positivas para COX-2 em E (D). Notar a diferença significativa entre os grupos para cada variável. Testes não paramétricos de Mann-Whitney. PAS=Ácido Periódico de Schiff; COX-2 GND = glândula não dilatada; COX-2 GC = glândulas císticas; COX-2 E = estroma periglandular	23

## **AVALIAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO de COX-2 EM CARCINOMAS INTESTINAIS CANINOS**

### **RESUMO**

Devido ao aumento da expectativa de vida dos animais de estimação, o aparecimento de neoplasias tem se tornado uma importante afecção na Medicina Veterinária. As neoplasias gastrointestinais de cães são pouco diagnosticadas e sua etiologia é desconhecida. As localizações mais frequentes são o jejuno, cólon e reto. Objetivou-se avaliar a Cox-2 por meio de imunohistoquímica e a intensidade de PAS positivo nas amostras de intestinos de cães saudáveis (GS) e com neoplasia (GN). As neoplasias foram classificadas por análise histopatológica. As diferenças foram significativas quando  $P < 0.05$  (testes não paramétricos). Nas amostras neoplásicas observou-se imunodeteção acentuada de COX-2, quando comparadas aos cães saudáveis, com diferenças significativas entre os grupos. O mesmo ocorreu para a intensidade de PAS, onde se observou diminuição do número de células caliciformes e aumento na produção de muco nas amostras neoplásicas, enquanto nas amostras saudáveis observou-se marcação intensa nas células caliciformes. Com isso pode-se concluir que a COX está envolvida na capacidade do tumor evadir as defesas do sistema imunológico. Apesar da relação entre o processo inflamatório, mais especificamente o papel das prostaglandinas, e o desenvolvimento e propagação tumoral ser bastante claro, ainda muito se têm a ser esclarecido.

**Palavras-chave:** Cães, Células Caliciformes, Intestino, Neoplasias, PAS.

# EVALUATION of COX-2 IMMUNOSTAINING IN CANINE INTESTINAL CARCINOMAS

## ABSTRACT

Due to the increase in the life expectancy of the pets, the appearance of neoplasias has become an important affection in the Veterinary Medicine. Gastrointestinal neoplasms of dogs are poorly diagnosed and their etiology is unknown. The most frequent locations are jejunum, colon and rectum. The objective of this study was to evaluate Cox-2 by means of immunohistochemistry and the positive PAS intensity in intestinal samples from healthy dogs (GS) and neoplasia (GN). The neoplasms were classified by histopathological analysis. The differences were significant when  $P < 0.05$  (non-parametric tests). In the neoplastic samples, marked COX-2 immunodetection was observed when compared to healthy dogs, with significant differences between groups. The same was observed for PAS intensity, where a decrease in the number of goblet cells and an increase in the mucus production were observed in the neoplastic samples, while in the healthy samples intense marking was observed in the goblet cells. With this we can conclude that COX is involved in the ability of the tumor to evade the defenses of the immune system. Although the relationship between the inflammatory process, more specifically the role of prostaglandins, and tumor development and propagation is very clear, much remains to be elucidated.

**Keywords:** Dogs, Caliciforms Cel's, Intestine, Neoplasm, PAS.

## 1.INTRODUÇÃO

Atualmente, as neoplasias são as principais causas de óbito em cães e gatos (BARROS et al., 2017). São caracterizadas como processo complexo decorrente do desequilíbrio entre o crescimento e a divisão celular, resultando no acúmulo de inúmeras mutações genéticas que provocam alterações no ciclo celular normal (DALECK et al., 2016). É uma doença heterogênea que está relacionada a diversos eventos como os envolvidos no crescimento, diferenciação e proliferação celular, invasão e desenvolvimento de metástases (BECKMANN et al., 1997; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A manifestação clínica dos processos neoplásicos pode ser bastante variável. É provável que a alta prevalência de processos malignos nas espécies canina e felina, estejam associadas à maior longevidade desses animais, o crescente aumento populacional (BARROS et al., 2017) e a exposição a agentes cancerígenos (ROZA et al., 2008).

Em cães, o sistema gastrointestinal pode ser acometido por neoplasias de várias origens, como os epiteliais, mesenquimais e de células redondas. Os segmentos intestinais como jejuno, cólon e reto foram identificados como os mais afetados, sendo os adenocarcinomas, leiomiossarcomas e linfomas as neoplasias mais observadas (GOMES et al., 2014).

Inclui-se entre os fatores ambientais variedades de agentes mutagênicos, possivelmente carcinógenos, que estão presentes nos alimentos, no ar, na água e no solo (DALECK et al., 2016). Supõe-se também que algumas substâncias possam atuar como agentes carcinógenos, por exemplo, algumas micotoxinas provenientes de alimentos contaminados e que são encontradas principalmente em queijos, carnes, leite e ovos (NETTO et al., 1999).

Estudos demonstram associação entre a dieta rica em carne vermelha e obesidade entre cães com até um ano de idade e o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias, período em que os efeitos hormonais são prejudiciais a este tecido. Obesidade e uso excessivo de pesticidas são fatores de risco para o desenvolvimento de carcinomas de células transicionais (DAGLI, 2015). Outros

estudos apontam a interferência de outros fatores como: algumas plantas tóxicas, como por exemplo o tanino, proveniente de samambaias, a da incidência de radiação gama, hidrocarbonetos policíclicos com origem na combustão de compostos orgânicos a altas temperaturas, compostos nitrogenados, herbicidas e aminas aromáticas presentes em grãos, vegetais e frutas (NETTO et al., 1999).

Outros fatores que vêm sendo estudados, como a expressão de COX-2 (Ciclooxigenase-2) e a presença de células caliciformes nos tecidos. Existem alguns mecanismos que associam a ação da COX-2 ao câncer, entre eles podemos listar a promoção da angiogênese, a proliferação celular, a inibição da apoptose e o aumento da expressão de Bcl-2 (B-cell Lymphoma 2), além da diminuição da adesão celular, o que confere maior capacidade de invasão, metástase e lise das membranas basais (MILANTA et al., 2006). Quanto as células caliciformes, estudos apontam que as mesmas são responsáveis pela produção do muco que lubrifica todo o intestino e alterações nessa produção pode comprometer o funcionamento do órgão, e essas alterações podem estar relacionadas a processos inflamatórios locais.

Claramente, são necessárias pesquisas adicionais a respeito desses imunomarcadores. Não se sabe ainda se a COX-2 está presente apenas nos tecidos neoplásicos estimulando e favorecendo o seu crescimento ou se ela seria um bom alvo para o tratamento, visando minimizar os efeitos deletérios do câncer. Nem mesmo, se a diminuição de células caliciformes nos tecidos neoplásicos, está intimamente ligado a alterações causadas pela neoplasia.

Com isso objetivou-se com este estudo avaliar a imunodetectção de COX-2 em carcinomas intestinais caninos e estabelecer relação entre a presença de COX-2 e o prognóstico da neoplasia. Avaliar a presença de células caliciformes por PAS (Periodic Acidific Schiff) em intestinos saudáveis e neoplásicos.

## 2.REVISÃO DA LITERATURA

O epitélio cólico representa a mais perfeita barreira funcional do corpo humano, o que também se evidencia nos animais. Uma única camada de células justapostas, aderidas umas às outras e à membrana basal, separa o interior da luz intestinal, com grande concentração bacteriana, das camadas internas estéreis que formam a parede intestinal. Essa barreira funcional é composta por diversas linhas de defesa representadas, principalmente, pela camada de muco que recobre a superfície epitelial, as membranas apicais e basolaterais das células, o complexo sistema de junções intercelulares e a membrana basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O intestino grosso é constituído por: ceco, cólon, reto e ânus. A camada mucosa não tem pregas, exceto em sua porção distal (reto), nem vilosidades. As criptas intestinais são longas e caracterizadas pela presença acentuada de células caliciformes, as quais são responsáveis pela produção de muco e lubrificação do tubo digestório, além de pequeno número de células enteroendócrinas (DYCE; SACK; WENSING, 2010).

O muco que recobre o epitélio intestinal, secretado por células caliciformes presentes nas glândulas de todo tubo digestivo, forma a primeira linha de defesa da mucosa cólica. As células caliciformes variam em número ao longo dos diferentes segmentos do intestino grosso, aumentando à medida que se progride em direção aos segmentos mais caudais onde ocupam, praticamente, toda a extensão das glândulas (MELLO et al., 2012).

Alterações na população de células caliciformes ao comparar-se os diferentes segmentos cólicos, encontram-se relacionados às distintas funções fisiológicas exercidas pela mucosa de cada porção intestinal. No cólon, a camada de muco além da função lubrificante, que facilita a progressão do conteúdo fecal, confere proteção química contra agressão ocasionada por antígenos, toxinas e enzimas digestivas existentes no interior da luz. O muco possui, ainda, propriedades bactericidas, pois reduz a população bacteriana em contato direto com a superfície epitelial, dificultando a translocação para o meio interno (HALL; GERMAN, 2005).

Anormalidades na secreção, composição e padrão de distribuição das mucinas nas criptas intestinais vêm sendo demonstradas em diversas doenças inflamatórias que acometem o cólon. Há dúvidas se essas alterações encontram-se relacionadas às modificações na população de células caliciformes ou maior capacidade de produção de muco pelas células do epitélio cronicamente inflamado (GERMAN; HALL, 2003)

O número de células caliciformes, indiretamente, reflete a capacidade de secreção de muco e a atividade das glândulas colônicas, cuja função é produzir e secretar mucinas ao longo de todo o trato gastrointestinal (KELI et al., 1997). É possível avaliar a presença dessas células, por meio da marcação histoquímica de Periodic Acid-Schiff (PAS) (ELSTON; ELLIS, 1998).

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), existem diversas alterações na fisiologia celular do sistema gastrointestinal, que podem culminar no desenvolvimento de neoplasias, como; densidade da apoptose, potencial replicativo ilimitado das células epiteliais, insensibilidade à inibição de fatores de crescimento, angiogênese contínua, mecanismos de invasão e metástase celular, auto-suficiência de fatores de crescimento e mecanismos inflamatórios promotores de crescimento tumoral.

As neoplasias benignas geralmente têm crescimento lento, com evolução de semanas ou mesmo anos, são bem circunscritas, não dolorosas, móveis e com reação inflamatória mínima. Já as neoplasias malignas tendem a apresentar crescimento rápido, a presença de lesões ulceradas é frequente e podem infiltrar-se nos tecidos vizinhos bem como sofrer metástases à distância (BREARLY, 2003). As localizações mais frequentes para o aparecimento de neoplasias em cães são as glândulas mamárias, seguidos de neoplasias cutâneas, tecidos hematopoiéticos (incluindo tecido linfóide), aparelho urogenital, sistema endócrino, aparelho digestório (DOBSON e MORRIS, 2007).

As neoplasias intestinais podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua origem celular, sendo elas de origem mesenquimal, de células redondas e de células epiteliais. Dentre as neoplasias intestinais de origem mesenquimal, os

leiomiomas e os leiomiossarcomas, são os mais observados, sendo comumente localizados em intestino grosso. Das neoplasias de células redondas, os linfomas são os principais representantes desse grupo e apresentam-se com maior frequência no intestino delgado e cólon (DALECK et al., 2016).

Com relação às neoplasias de origem epitelial, os adenocarcinomas intestinais são neoplasias que se originam das células das criptas e podem formar lesões nodulares únicas ou múltiplas, em forma de placa, com ou sem superfície ulcerada, podendo ou não haver comprometimento mural, que pode culminar em estenose e consequente fibrose da parede e diminuição do lúmen intestinal (LEANDRO, 2010). Esta neoplasia pode ser classificada como infiltrativa nos casos onde a área espessada e estenótica obstrui o lúmen intestinal; ulcerativa, quando possui úlcera profunda, fibrosada e com bordas elevadas; proliferativas, nas quais massas lobuladas se expandem intraluminalmente, ou mucinoso, quando há expansão transmural para o mesentério com acúmulo variável de mucina (FOSSUM; CHERRYL, 2014).

Os adenocarcinomas intestinais geralmente desenvolvem-se como massas solitárias e com rápida propensão à metástase para linfonodos regionais (BILEK; HIRT, 2007). Eles podem ser classificados como :

- Tipo acinar: nas estruturas glandulares surge material amorfo eosinofílico e ocorre infiltração da mucosa, da submucosa e da camada muscular.
- Tipo sólido indiferenciado: infiltração da mucosa e parede intestinal com células epiteliais anaplásicas e células neoplásicas que apresentam citoplasma basofílico e grandes núcleos vesiculares com nucléolos evidentes
- Tipo mucinoso: proliferação de células epiteliais anaplásicas, com citoplasma eosinofílico pálido, criptas acinares ou irregulares. Também são observados grandes espaços extracelulares com muco no estroma

- Tipo papilar: alto índice mitótico com proliferação papilar para o lúmen intestinal. As criptas encontram-se hiperplásicas e o tumor tem um aspecto de invasão local (BABA; CÂTOI, 2007).

São classicamente encontrados em cães mais velhos, onde os sinais clínicos tornam-se inespecíficos e podem variar de acordo com a localização da lesão. Nos casos em que as formações situam-se no intestino delgado, o animal pode apresentar anorexia, vômito, dores abdominais, perda de peso, melena e diarreia. Já em casos nos quais os tumores acometem o intestino grosso, ocasionalmente os sinais clínicos são diarreia, tenesmo, hematoquesia, disquesia e em alguns casos, prolapso retal. Os processos obstrutivos são comuns nesses casos, podendo ser um dos principais motivos pelos quais os pacientes são levados ao atendimento clínico (BILEK; HIRT, 2007).

As neoplasias intestinais podem cursar com alterações hematológicas significativas, como anemia discreta ou moderada, resultante muitas vezes da perda de sangue. Pode haver leucocitose, caracterizada por neutrofilia e linfopenia, como síndrome paraneoplásica pela produção de fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos à partir das células tumorais, hipoalbuminemia, hipoglicemia e/ou atividades séricas de enzimas hepáticas elevadas (DALECK; RODASKI, 2008).

A realização da anamnese e exame físico detalhado podem auxiliar o clínico na suspeita da presença de neoplasias abdominais. O inquérito deve incluir perguntas acerca da evolução ao longo do tempo, bem como o aparecimento de sinais clínicos, tipo de alimentação e resposta a protocolos terapêuticos anteriores. Os linfonodos também devem ser examinados, considerando o seu tamanho, forma, textura e mobilidade. Se estes apresentarem aumento de tamanho, irregularidade da superfície, endurecimento e/ou falta de mobilidade podem ser sugestivos de envolvimento neoplásico. Contudo, linfadenopatia moderada pode estar associada apenas à hiperplasia reativa e não necessariamente à presença de focos metastáticos os quais são facilmente diferenciados por exames citológicos e histopatológicos (WITHROW, 2013).

Os carcinomas no cólon ascendente ou descendente são mais difíceis de diagnosticar quando comparado às neoplasias retais. Imagens radiográficas podem evidenciar massas, presença de líquido livre ou gás abdominal e deslocamento de vísceras. Imagens contrastadas podem delinear regiões de irregularidade da mucosa, estreitamento luminal e infiltração intraluminal, além de espessamento ou nodularidade. Radiografias torácicas devem ser realizadas, para avaliação de focos metastáticos intratorácicos (KEALLY; McALLISTER, 2005).

As imagens ultrassonográficas podem evidenciar massas ou formações, associadas ou não à obstrução de trânsito, avaliar o espessamento da parede intestinal, a aparência e simetria das várias camadas da parede, o número de contrações peristálticas, o padrão do conteúdo intestinal e principalmente a localização e extensão da lesão (NYLAND; MATTOON, 2000).

As técnicas endoscópicas são úteis na localização de formações no cólon e no reto, além de ser método eficaz para coleta de biópsias da mucosa intestinal (DALECK et al.; 2016). A colonoscopia tende a ser mais sensível para encontrar tumores do cólon e permitirá o diagnóstico definitivo (FORREST, 2007). Biópsias realizadas por meio de endoscopias, laparoscopias, colonoscopias, proctoscopias são, muitas vezes, os principais pilares do diagnóstico definitivo, pois é possível obter fragmentos pequenos e superficiais, porém deve-se considerar a possibilidade de algumas lesões estarem situadas nas camadas intestinais mais profundas, o que pode ser limitante para determinar o grau de infiltração na parede intestinal (FORREST; LIPTAK, 2007).

A laparotomia exploratória é uma das técnicas mais eficazes para se realizar biópsias de diferentes segmentos intestinais, pois é possível retirar todas as camadas do intestino, facilitando o diagnóstico, bem como determinar o grau de infiltração na parede intestinal (FOSSU; CHERYL, 2014). Além disso, este procedimento nos garante a obtenção de amostras sob visão direta e em quantidade adequada para exames histopatológicos, imunohistoquímicos e moleculares (DALECK; RODASKI, 2008).

A laparotomia exploratória ainda auxilia principalmente na identificação do comprometimento ou não de outras vísceras, permitindo a realização de análise histopatológica e, com isso, o correto estadiamento do paciente, além de também ser a abordagem terapêutica para a remoção de obstruções ou constrictões de segmentos intestinais. O diagnóstico diferencial das neoplasias intestinais inclui obstruções por corpos estranhos, colites ulcerativas, enterites parasitárias, virais, alérgicas ou enteropatias (DALECK et al., 2016).

O tratamento de pacientes com carcinomas intestinais comumente inclui a ressecção cirúrgica do segmento intestinal comprometido. As técnicas de enterectomia e enteroanastomose intestinal devem ser praticadas sempre que possível, com margens de segurança adequadas (DALECK; RODASKI, 2008). Cura cirúrgica de lesões malignas é possível, mas a metástase regional é comum. Em humanos, já foi relatado que se o paciente não apresentar complicações, a ressecção do tumor pode atenuar o quadro clínico do paciente por meses (WITHROW, 2013).

A quimioterapia adjuvante após a ressecção cirúrgica de tumores não totalmente ressecados, ou até como tratamento paliativo, nos casos de doença disseminada é indicada, embora ainda não exista comprovação de protocolos eficazes em cães, sendo empregados os mesmos de seres humanos (DALECK et al., 2016).

Métodos de terapia tradicionais como cirurgia e quimioterapia, podem ser somados a outras terapias, como: eletroterapia, terapia fotodinâmica, radioterapia, braquiterapia, terapias dirigidas ao alvo e metronômica (FOSSUM; CHERRYL, 2014).

Ainda no contexto do tratamento, alguns estudos correlacionam o uso de alguns medicamentos para o controle das neoplasias, dentre eles o uso crônico de anti-inflamatórios não estereoidais (AINE's) (MURO et al., 2008). Isso ocorre devido ao fato da reação inflamatória ser procedimento normal inerente ao organismo sadio, que visa expulsar agentes invasores ou perturbadores da homeostasia, a fim de resolver transtornos por eles causados. Entretanto, apesar de normalmente ser um

processo benéfico, a resposta inflamatória pode tomar rumos incontroláveis, trazendo transtornos severos que podem culminar com a perda da função do órgão ou tecido afetado (RAMOS et al., 2010).

A cicloxigenase (COX) sinônimo de prostaglandina H sintetase é uma enzima bifuncional, catalizadora de cicloxigenação e peroxidação do ácido aracdônico derivado das membranas celulares. Essas duas isoenzimas (isoformas) são responsáveis pela síntese de prostaglandinas. A prostaglandina 1 (COX 1) é uma enzima constitutiva, geralmente expressa nos tecidos. As prostaglandinas, prostacilinas e tromboxano sintetizados por esta enzima são responsáveis pelas funções fisiológicas normais, como citoproteção, vasodilatação e agregação plaquetária (MEADE et al., 1994).

A prostaglandina sintetase 2, também conhecida como Cicloxigenase 2(COX 2) é uma enzima, que é induzida e sintetizada por macrófagos e células que participam da resposta inflamatória após serem estimuladas por citocinas e outros mediadores inflamatórios, como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), fatores de crescimento, principalmente o epidermal (EGF) e o fator de crescimento de fibroblastos (FGF), endotoxinas bacterianas, ou ainda por estímulos hormonais ou neoplásicos (MILANTA et al., 2006; DUMUSC et al., 2014). É sabido que as enzimas cicloxigenases catalisam a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico. A COX-2 é uma enzima induzida e expressada por células que participam do processo inflamatório, além de tecidos neoplásicos e por outras condições patológicas (GASPARINI et al., 2003).

Alguns estudos revelaram que a COX 2 apresenta importante papel na oncogênese, crescimento tumoral e angiogênese. Porém, o mecanismo de ação na carcinogênese ainda não está totalmente elucidado (DE NARDI, 2008). Sabe-se que a COX-2 influencia na ativação de metaloproteinases que possibilitam o rompimento das membranas basais pela lise de colágeno e ação de gelatinases, além disso modula a angiogênese pelo estímulo da produção de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (AMORIM, 2008).

Os experimentos de Kutchera et al. (1996) para determinar o mecanismo envolvido a partir destas observações, encontraram em humanos e animais elevada expressão para a COX-2 nos tumores de cólon e reto, enquanto que áreas normais de mucosa intestinal possuíam baixas ou nenhuma expressão para a COX-2. Estas descobertas lideram a hipótese de que a COX-2 pode estar envolvida na determinação do crescimento e progressão do câncer de cólon.

A COX 2 possui papel vital na regulação da angiogênese associada com a proliferação das células neoplásicas (TSUJII et al., 1998; QUEIROGA et al., 2005). O aumento na expressão desta enzima COX-2 está relacionado à produção do fator de crescimento endotelial, determinando a habilidade para estimular o desenvolvimento de células endoteliais e promover a angiogênese. A maioria dos tumores sólidos necessita de novos vasos sanguíneos para obter os nutrientes necessários para garantir seu crescimento e sobrevivência. O surgimento deste novo aporte sanguíneo (angiogênese) é também importante para a ocorrência de metástases (WANG; DUBOIS, 2004; KNOTTENBELT et al., 2006). A partir disto, os inibidores para a COX-2 podem bloquear o crescimento dos vasos sanguíneos relacionados com o desenvolvimento tumoral (WOLFESBERGER et al., 2006).

Inibidores de COX-2 seletivos, têm mostrado atrasar significativamente a incidência de tumores mamários em camundongos transgênicos (MILANTA et al., 2006), reduzindo o crescimento e o desenvolvimento de tumores, melhorando o prognóstico e o tempo de sobrevivência do paciente (SUBBARAMAIAH; DANNENBERG, 2003).

Desta forma, os inibidores da cicloxigenase-2, ou coxibes (anti-inflamatórios não esteroides (AINEs)), têm como alvo a COX-2, enzima responsável pela produção de mediadores da inflamação e do processo nociceptivo, como as prostaglandinas. A seletividade para esta enzima minimiza os riscos e os efeitos adversos dos restantes AINEs. Observações pioneiras demonstraram concentrações superiores intratumorais de prostaglandinas em relação ao tecido normal circundante, o que se correlaciona com o fato de estas desempenharem papel promotor no processo de carcinogênese. Assim, os coxibes têm sido vistos como potencial agente

antineoplásico que advém dos seus efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativo e pró-apoptótico, antimetastático, de inibição da angiogênese e de imunomodulação (SIMMONS et al., 2004). Alguns estudos visam instituir a administração de medicamentos anti-inflamatórios não esteroides como por exemplo: meloxicam, nimesulida, piroxicam, ibuprofeno, diacereina, celecoxibe, buscando aliviar os sintomas causados pelos carcinomas intestinais, aumentando assim a expectativa prognóstica (MILANTA et al., 2006).

Diante disso, a expressão da imunodeteção da proteína COX-2 pela técnica de imunohistoquímica se torna fator de grande importância, pois a COX-1 é expressa constitutivamente nos tecidos, enquanto a COX-2 é usualmente ausente ou expressa em quantidades muito pequenas em tecidos normais (MILANTA et al., 2006). O aumento da imunomarcaçãõ da COX-2 pode ser observada em uma variedade de tumores, incluindo os intestinais, pulmonares, gástricos, mamários, uterinos, prostáticos e vesicais. Durante a carcinogênese, o aumento da expressão da COX-2 pode resultar em grande variedade de interações celulares (FOSSLIEN, 2000; TURINI; DUBOIS, 2002).

Desse modo, a imunodeteção da COX-2 pode ser importante tanto para auxiliar na caracterização da neoplasia, e poderá auxiliar em uma nova abordagem terapêutica para os animais que apresentem carcinomas intestinais.

### 3. OBJETIVOS

- ✓ Determinar a marcação de células caliciformes por PAS (Periodic Acidific Schiff), em intestinos saudáveis e neoplásicos.
- ✓ Determinar a marcação de COX-2 em intestinos saudáveis e neoplásicos
- ✓ Estabelecer relação entre a presença de COX-2 e o prognóstico da neoplasia.
- ✓ Estabelecer relação entre a presença de células calificiformes e a neoplasia.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos Éticos**

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP - Câmpus de Jaboticabal - SP. Executado de acordo com as normas exigidas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Protocolo nº 12.420/2016.

### **4.2 Grupos Experimentais**

Neste estudo foram incluídos seis cães com diagnóstico histopatológico de Adenocarcinoma intestinal (Grupo N - Neoplásico), atendidos no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Câmpus de Jaboticabal.

Outras 10 amostras de intestinos saudáveis (Grupo S - Saudável), foram obtidas de pacientes hígdos submetidos a cirurgias eletivas (ovariohisterectomia e orquiectomia), com prévia autorização do proprietário, após assinatura do Termo de Esclarecimento Livre e Esclarecido. Todos esses pacientes apresentavam exames hematológicos dentro dos valores normais para a espécie.

### **4.3 Coleta das amostras**

As seis amostras do grupo neoplásico (GN) foram coletadas durante o procedimento cirúrgico para ressecção da neoplasia. Todas as amostras do presente estudo foram obtidas por meio de laparotomia exploratória de acordo com as técnicas habituais. As seis amostras do grupo neoplásico (GN) foram coletadas durante o procedimento cirúrgico para ressecção da neoplasia. As amostras do grupo saudável (GS) foram obtidas durante o procedimento de ovariohisterectomia e orquiectomia eletiva em animais sadios. Para tanto, em cada animal, foi coletada amostra da região do cólon, atingindo todas as camadas do órgão, segundo o protocolo instituído por DALECK; RODASKI (2008). Em seguida, este defeito foi

suturado com fio de nylon 3-0, posteriormente realizou-se a omentopexia no local da sutura, seguindo os procedimentos utilizados por FOSSUM; CHERYL (2014).

As amostras do grupo neoplásico (GN) foram encaminhadas para análise histopatológica e classificação do tipo de neoplasia segundo Santos e Alessi (2016) e Meuten (2017). Todas as amostras foram fixadas em solução tamponada de formol a 10% e processadas no Laboratório de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

#### **4.4 Avaliações Histopatológicas**

##### **4.4.1 Grupo Neoplásico (GN)**

Após diagnóstico de carcinoma intestinal, obtido por meio de análise histopatológica, as amostras coletadas foram analisadas pela técnica de imunohistoquímica para se avaliar a imunomarcagem proteica de COX-2, e análise histoquímica para se avaliar a marcação de PAS (Periodic Acidific Schiff).

##### **4.4.2 Grupo Saudável (GS)**

As amostras dos animais do grupo saudável, foram coletadas por meio de cirurgia eletiva de ovariectomia e laparotomia exploratória e em seguida passaram por análise histoquímica de PAS para se avaliar a expressão de células calciformes nos tecidos e análise imunohistoquímica para se avaliar a expressão proteica de COX-2.

#### **4.5 Análise Histopatológica e Histoquímica**

Foram colhidos fragmentos de neoplasia intestinal (grupo neoplásico), para análise em microscopia de luz. Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, tamponado com fosfatos 0,15 Molar de pH 7,2. Após 24 horas de fixação foram desidratados em soluções de concentração crescente de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina de acordo com a técnica histológica de rotina. Os cortes foram feitos na espessura de 5µm e corados com hematoxilina e eosina, para

classificação neoplásica e pela coloração de ácido periódico de Schiff (PAS) para detecção de células calciformes e da quantidade de mucina.

Estas amostras foram avaliadas de acordo com a classificação neoplásica segundo Santos e Alessi (2016) e Meuten (2017). Para a detecção da média de células calciformes, avaliou-se 100 glândulas por amostra por animal e divididas em três regiões, glândulas não dilatadas (GND), glândulas císticas (GC) e estroma periglandular (E). Correlacionando estes resultados com as características histológicas do cólon normal e com alterações patológicas, descrito na literatura (PIVA et al.; 2011). Esses achados foram associados com os achados histopatológicos e tempo de sobrevivência

#### **4.6. Análise Imunohistoquímica**

O protocolo utilizado para a imunomarcagem do anticorpo COX-2 foi: desparafinização dos cortes de intestino (saudável e neoplásico) em estufa a 60°C / 1 hora e 20 minutos em xilol. Após essa etapa, as amostras foram hidratadas em soluções decrescentes de álcool, até um banho em água destilada. Posteriormente fez-se a recuperação antigênica com Câmara de pressão Pascal (Dako) com solução tampão de citrato de sódio 10 mM, pH 6,0. Para o bloqueio da peroxidase endógena utilizou-se uma solução a 8% (92 mL de álcool metílico e 8 mL de peróxido de hidrogênio 30 volumes) por 20 minutos, à temperatura ambiente, em câmara escura e protegidos da luz. Após fez-se o bloqueio das reações inespecíficas (Protein Block, Dakocytomation, cód. X0909) por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti COX2 Mouse monoclonal Marc, BIOCARE, cód. CM164C – na diluição de 1:500 por 2 horas em temperatura ambiente. Após, os cortes foram incubados com polímero ligado a peroxidase (Kit Advance HRP®, Dako Cytomation, código K406889-2). Entre cada um dos passos descritos fez-se banhos em água destilada e em solução tampão Tris HCl, pH 7,4. Para a visibilização da reação utilizou-se o cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina – Dakocytomation, cód. K3468-1). A contra-coloração foi feita com Hematoxilina de Harris e a montagem das lâminas com Entellan (Merck).

O controle negativo foi realizado com o diluente de anticorpo (Dakocytomation, código S302283-2), em substituição ao anticorpo primário. O controle positivo foi realizado, segundo sugerido pelo fabricante do anticorpo.

Para a determinação do número de células imunomarcadas avaliou-se 100 glândulas por amostra histológica por animal (Nikon Eclipse E200) na objetiva de 40x, a qual apresenta área de 0,19625 mm<sup>2</sup>. Nestas áreas avaliou-se as imunomarcações nas regiões das glândulas não dilatadas (GND), nas glândulas císticas (GC) e no estroma. A partir dos valores obtidos nestas amostras, fez-se média do número de células imunomarcadas por fragmento em cada animal, sendo essas médias avaliadas em cada grupo de cães (neoplásico e saudável).

#### **4.7 Análise Estatística**

Os dados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Friedman, considerando-se as médias das imunomarcações de COX2 e de células calciformes por PAS, nos fragmentos de neoplasia (cães neoplásicos) e controle (cães saudáveis) e as diferenças entre as variáveis pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn. Para a avaliação de cada variável entre os grupos, realizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para as correlações entre as variáveis por grupo, realizou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman. Para todas as análises considerou-se diferenças significativas quando  $P < 0,05$ , utilizando o programa Graphpad Prism (versão 5.00, 2007).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Pacientes

As Tabelas 1 (GN) e 2 (GS) descrevem os pacientes pertencentes aos grupos experimentais deste estudo.

**Tabela 1.** Pacientes pertencentes ao Grupo Neoplásico (GN), com diagnóstico histopatológico de neoplasia intestinal. Jaboticabal, 2017.

RAÇA	IDADE	GÊNERO	NEOPLASIA
<b>Boxer</b>	8 anos	Fêmea	Adenocarcinoma acinar
<b>Poodle</b>	10 anos	Fêmea	Adenocarcinoma acinar
<b>Labrador</b>	8 anos	Macho	Adenocarcinoma acinar
<b>Daschund</b>	10 anos	Fêmea	Adenocarcinoma mucinoso
<b>Labrador</b>	8 anos	Macho	Adenocarcinoma papilífero
<b>Beagle</b>	7 anos	Fêmea	Adenocarcinoma papilífero

**Tabela 2.** Pacientes pertencentes ao Grupo Saudável (GS). Jaboticabal, 2017.

RAÇA	IDADE	GÊNERO	PROCEDIMENTO ELETIVO
<b>Yorkshire</b>	3 anos	Macho	Orquiectomia
<b>SRD</b>	5 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>SRD</b>	2 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>Maltês</b>	8 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>SRD</b>	6 meses	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>SRD</b>	1 ano	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>Pastor Alemão</b>	2 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>SRD</b>	7 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia
<b>SRD</b>	5 anos	Fêmea	Ovariohisterectomia

SRD: sem raça definida

Os resultados deste estudo serão apresentados sob forma de imagens (Figura 1 e 2) e suas representações estatísticas (Figuras 3 e 4).

Os pacientes do Grupo Neoplásico (GN) incluídos no presente estudo eram cães com média de idade de sete a dez anos, assemelhando-se ao reportado na literatura, que considera animais com idade entre seis e nove anos os mais afetados por neoplasias intestinais (SELTING, 2013). Quanto às raças, as amostras do GN eram bastante heterogêneas, sendo que três cães eram de pequeno porte (50%), diferindo assim do que relata SELTING (2013); e CÉSAR et al. (2012), que afirmam

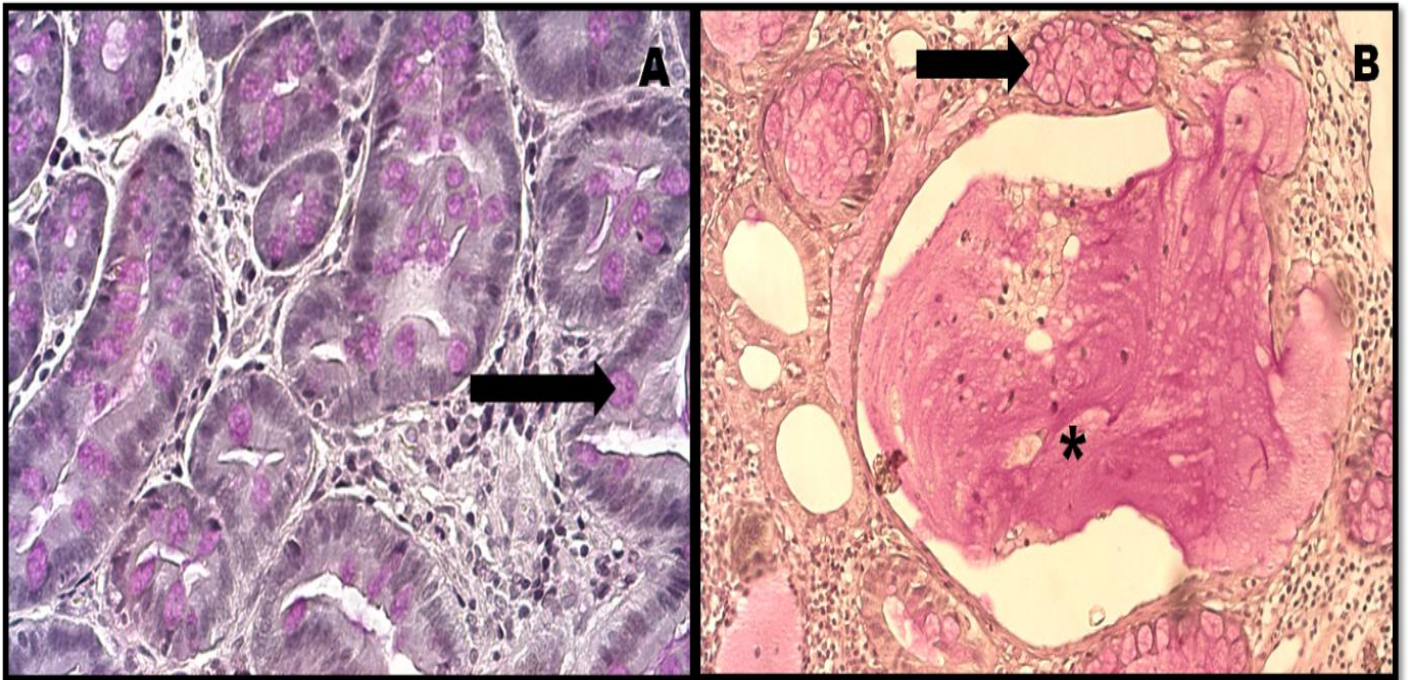
que os cães mais acometidos são os das raças grandes, principalmente Collies, Pastores Alemães, Rottweillers e Boxers. Com relação ao gênero, houve número idêntico de machos (n=3) em relação às fêmeas (n=3).

O trato gastrointestinal canino é um local em potencial para o aparecimento de vários tumores primários, que podem surgir no estroma intestinal, nas células redondas, no sistema neuroendócrino, e/ou células epiteliais das criptas intestinais, podendo afetar qualquer segmento do intestino grosso (HEAD et al., 2002; GOMES et al., 2014). Ainda assim, as neoplasias intestinais são incomuns em cães, representando apenas 1% dos tumores nesta espécie (SOBRAL et al., 2008). Enquanto na espécie humana, atualmente 500.000 pessoas morrem no mundo em consequência dessa mesma doença. Desta forma, descobertas atuais e futuras podem ser úteis para se definir protocolos terapêuticos.

O presente estudo discorda de alguns autores, pois a neoplasia mais observada foi Adenocarcinoma em 100% das amostras analisadas. No que concerne às neoplasias, o linfoma intestinal, segundo RICHTER (2008), é a neoplasia mais diagnosticada no cão e no gato e a mais comum no trato gastrointestinal. Os linfomas são os tumores intestinais mais comuns, seguidos por adenocarcinomas, que correspondem a 0,18 a 0,3% dos casos (HEAD et al., 2002).

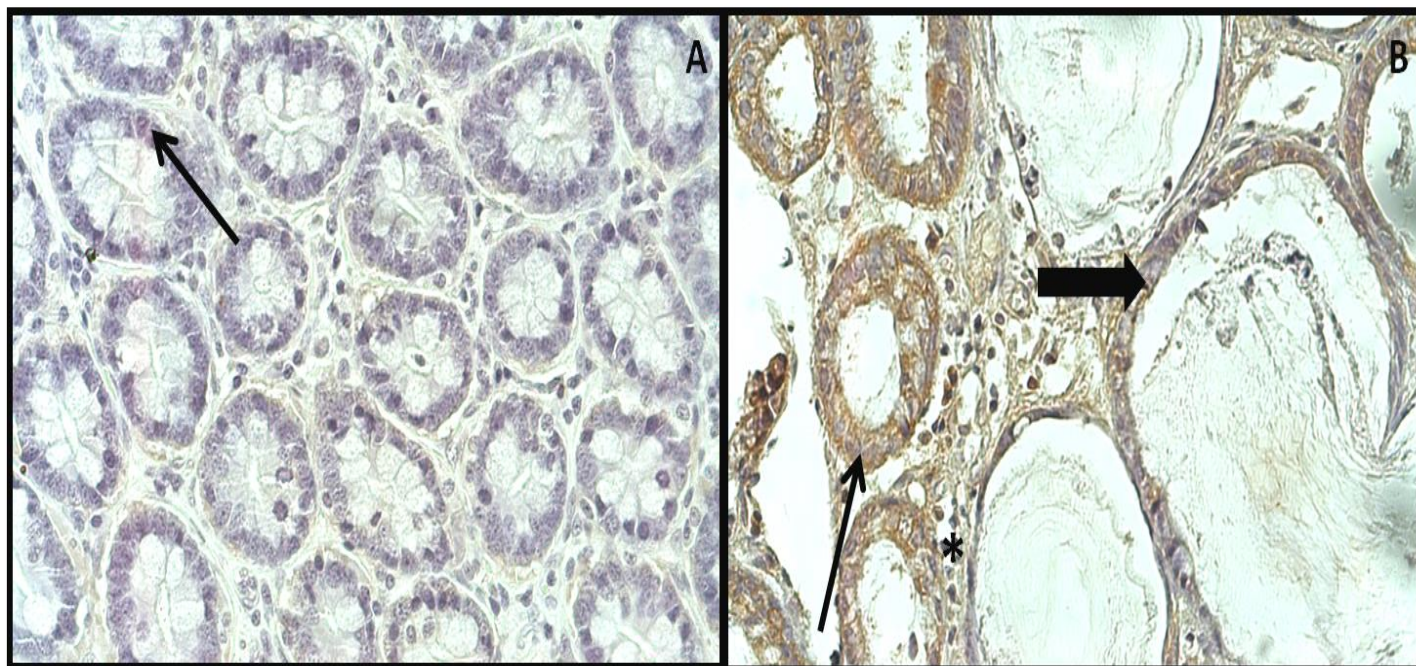
No presente estudo, 50% das amostras obtidas tratavam-se de Adenocarcinoma Acinar, 37,5 % Adenocarcinoma Papilífero e 12,5% Adenocarcinoma Mucinoso. Sabe-se que os adenocarcinomas são divididos em quatro subgrupos dependendo da localização e comportamento do tumor;

Observou-se claramente a marcação histoquímica de PAS de forma acentuada nas células caliciformes nas amostras do grupo saudável (GS) e diminuição das células caliciformes além de aumento na região tumoral das glândulas císticas nas amostras neoplásicas do grupo neoplásico (GN) (Figura 1).



**Figura1.** Fotomicrografia das amostras de intestino. (A) Nota-se em animais saudáveis, a presença acentuada de células caliciformes (seta) presente no epitélio glandular, Objetiva 40x. (B) Observa-se em animais doentes predomínio de conteúdo positivo ao PAS no interior das glândulas císticas (\*) e de forma discreta a moderada nas células caliciformes do epitélio glandular (seta), Objetiva 20x. Ácido periódico de Schiff (PAS).

Pode-se evidenciar que a marcação de COX-2 aparece bem discreta nas amostras do grupo saudável (GS), contrapondo o resultado encontrado nas espécimes tumorais, onde a expressão de COX-2 mostrou a expressão do marcador (Figura 2).

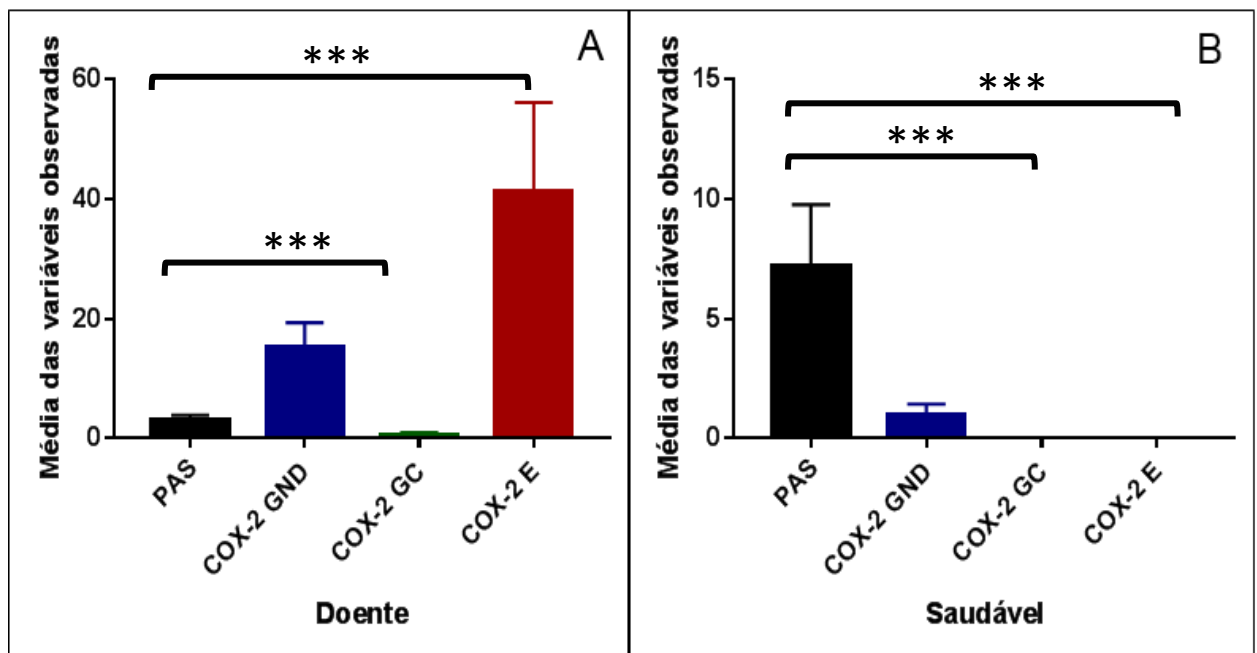


**Figura 2.** Fotomicrografia das amostras de intestino. (A) Nota-se em animais saudáveis (GS) a imunomarcção granular intracitoplasmática do anticorpo anti-COX2 de forma focal e discreta no eptélio glândular (seta). (B) Observa-se em animais doentes (GN) a imunomarcção de membrana celular e citoplasmática de forma acentuada e difusa no eptélio glandular (seta fina), nas áreas císticas da neoplasia (seta grossa) e no infiltrado inflamatório mononuclear em região de estroma tumoral (asterisco), Objetiva 40x.

Margulis et al. (2007), obtiveram resultados semelhantes, pois relataram que a imunomarcção de COX-2 foi praticamente nula em tecido normal em humanos. A imunorreatividade da COX-2 nos espécimes tumorais foi crescente de acordo com o grau de malignidade do tumor, corroborando os achados de diversos autores em diferentes neoplasias tanto em humanos como em animais, que propõem que esta enzima seja responsável pelo desenvolvimento e progressão tumoral (TSUJII et al., 1998; CAO e PRESCOTT, 2002; DORÉ et al., 2003; DE NARDI et al.; HELLER et al.; SHEEHAN et al., 2005; MIYASHITA et al., 2006; TAKATORI et al., 2007). KLIMP et al. (2001) e CERVELLO et al. (2005) também observaram imunorreatividade de

COX-2 em neoplasias ovarianas e carcinomas hepatocelulares, respectivamente, porém não evidenciaram correlação entre a imunomarcção e a malignidade da neoplasia.

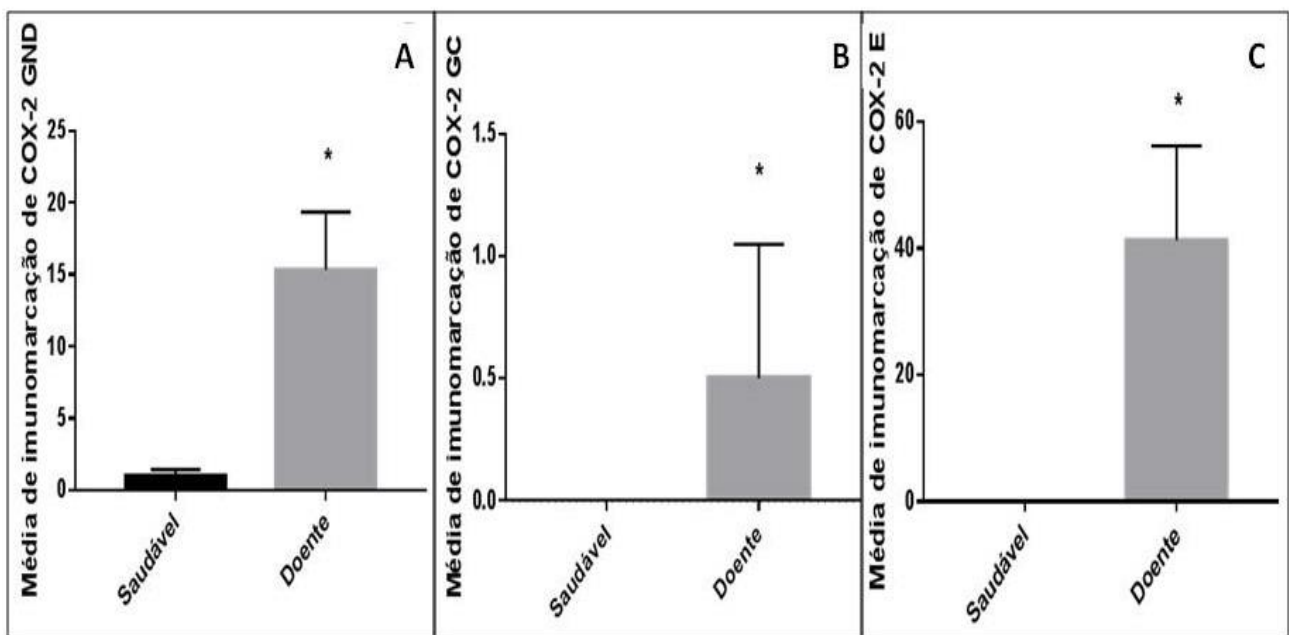
Os resultados obtidos por meio da imunomarcção de COX-2 neste estudo mostram a diferença entre a marcação nos grupos. O grupo neoplásico teve marcação superior ao grupo saudável, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Correlacionando esses resultados com a literatura estudada (HELLER et al., 2005). Os dados foram analisados pelo teste estatístico não paramétrico de Friedman, considerando-se as médias das imunomarcções de COX2 e de células calciformes por PAS, nos fragmentos de neoplasias (cães doentes) e controle (cães saudáveis) e as diferenças entre as variáveis pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn, onde o grupo controle apresentou resultados  $p < 0,0001$  (Figura 3)



**Figura 3.** Média das variáveis observadas nos animais saudáveis (A) e doentes (B). Notar a diferença significativa entre as variáveis em cada grupo Testes não paramétricos de Friedman e de Dunn.

PAS=Ácido Periódico de Schiff; COX-2 GND = glândula não dilatada; COX-2 GC = glândulas císticas; COX-2 E = estroma  
PAS e COX 2 GC apresentaram  $***p=0,0002$ . PAS e COX2 E  $***p=0,0002$ .

De acordo com Eberhart et al. (1994), a COX-2 está associada ao crescimento celular e ação de oncogenes. Esses autores demonstraram a presença de COX-2 no tecido neoplásico (câncer de cólon) e sua ausência em tecido normal (intestino). A alta expressão de COX-2 nas neoplasias tem sido associada a mecanismos de promoção tumoral, devido a indução da angiogênese, inibição da apoptose, aumento da capacidade de invasão e metástase, modulação da inflamação e da resposta imune (TSUJII et al., 1998; CAO; PRESCOTT, 2002; WANG; DUBOIS, 2004). Assim como em nosso estudo a comparação entre imunomarcações de COX-2 nas diferentes áreas avaliadas (GND, GC e E) entre os grupos (GN e GS), mostraram-se diferenças significativas em todas as áreas, onde os cães neoplásicos apresentam mais imunodeteccões de COX-2 quando comparados a cães saudáveis (Figura 4).



**Figura 4.** Imunomarcção de células positivas para COX-2 em GND (A), Imunomarcção de células positivas para COX-2 em GC (B) e Imunomarcção de células positivas para COX-2 em E (C). Notar a diferença significativa entre os grupos para cada variável. Testes não paramétricos de Mann-Whitney.

PAS=Ácido Periódico de Schiff; COX-2 GND = glândula não dilatada;  
COX-2 GC = glândulas císticas; COX-2 E = estroma periglandular

Em cães, além do uso convencional como anti-inflamatório, analgésico e antitérmico (GAYNOR, 2008; SUM e WARD, 2009) os inibidores de COX-2 são opção de tratamento para diferentes tumores em cães, particularmente os que apresentam aumento da expressão desta enzima, como carcinoma de células escamosas (ALMEIDA et al., 2001), carcinoma de células transicionais (DYDENSBORG et al., 2006) e alguns tipos de tumores de mama (DE NARDI et al., 2005; MILANTA et al., 2006). Apesar de toda investigação já realizada, continua a não haver consenso quanto ao uso estabelecido desta classe farmacológica como agentes anticancerígenos.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo, na maneira a qual fora realizado, nos permite concluir:

- ✓ Nos tecidos intestinais saudáveis existe maior número de células caliciformes e menor expressão de COX-2;
- ✓ Nas neoplasias intestinais de cães há menor número de células caliciformes, e intensa expressão de COX-2.
- ✓ Com esses achados, sugere-se que a Cox-2 estimula o processo inflamatório e neovascular, favorecendo assim o crescimento tumoral.
- ✓ Estudos futuros são necessários para este marcador, visando minimizar os efeitos deletérios do câncer.

## 7. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

AMORIM, R.L. Imunohistoquímica. In **Oncologia em cães e gatos**, 1ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 19, p 154-155, 2008.

BABA, A.; CÂTOI, C.; 2007. **Tumors of the alimentary system**. Acessado em 10 de Julho de 2017 em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9565/>

BARROS, J.C.; ALEXANDRE, N.A; CARVALHO, L.L.; COSTA, M.L.; NASCIMENTO, M.L.; STUPACK, E.C.; MARIANI, O.M.; JÚNIOR, D.P.; CALAZANS, S.G.; DIAS, F.G.G. **Perfil de cães geriátricos acometidos por neoplasias: estudo retrospectivo de 75 casos**. Anais do I Simpósio de Onco-Geriatria em pequenos animais, v. 16, n. 5 (2017).

BECKMANN, M. W.; NIEDERACHER, D.; SCHNÜRCH, H. G.; GUSTERSON, B. A.; BENDER, H. G. **Multistep Carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity**. *Journal of Molecular Medicine*, Berlin, v. 75, n. 6, p. 429–39, 1997.

CAO, Y.; PRESCOTT, S. M. **Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer**. *Journal of Cell Physiology*, v.190, n.3, p.279-286, 2002.

CERVELLO, M.; FODERA, D.; FLORENA, A. M.; SOREZI, M.; TRIPODO, C.; D'ALESSANDRO, N.; MONTALTO, G. **Correlation between expression of the cyclooxygenase-2 and the presence of inflammatory cells in human primary hepatocellular carcinoma: Possible role in tumor promotion and angiogenesis**. *World Journal Gastroenterology*, v.11, n.30, p. 4638-4643, 2005.

DAGLI, M.L.; JERICÓ, M.M.; NETO, J.P.A; KOGIKA, M.M. **Introdução à Oncologia Veterinária**. In **Tratado de Medicina Interna Cães e Gatos** vol.1ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pág. 479, 2015.

DALECK, C. R.; ROCHA, N. S.; FURLANI, J. M.; CESAR, J. R. F. **Neoplasias do Sistema Digestório**. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**, 1ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 19, p.322-326, 2016.

---

<sup>1</sup> Normas ABNT- NBR 6023/2002

DALECK, C. R.; RODASKI, S. **Cirurgia Oncológica**. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**, 1ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 19, p.154-155, 2008.

DE NARDI, A. B.; DALECK, C. R.; SOUZA, C. H. M.; LAUFER-AMORIN, R; RODASKI, S.; CALDERON, C; TORRES-NETO, R. **Cyclooxygenase -2 expression in mammary tumors in dogs and its correlation to histologic and biologic behavior**. *Veterinary and Comparative Oncology*, v.3, p.56–57, 2005

DE NARDI, A.B.; **Relação da COX-2 no desenvolvimento do câncer**. VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA. *Ciênc. vet. tróp. Recife-PE*, v. 11, suplemento 2, p. 87-89, novembro, 2008

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.3, p.146-154, 2010.

DYDENSBORG, A. B.; HERRING, E.; AUCLAIR, J.; TREMBLAY, E.; BEAULIEU, J.F. **Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon**. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 290, p.1067-1074, 2006.

DORÉ, M.; LANTHIER, I.; SIROIS, J. **Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors.** *Veterinary Pathology*, v. 40, n. 2, p. 207-212, 2003.

DOBSON, J.; MORRIS, J.; **Small animal Oncology.** Oxford: Blackwell Science Ltd. 1ª Edição. Editora Roca, cap. 8, p. 304, 2007.

DUMUSC, S.D.; ONTSOUKA, E.C.; SCHNYDER, M.; HARTNAC S.; ALBRECHT C.; BRUCHMAIER, R.M.; BURGNER, I.A. **Cyclooxygenase-2 and 5-Lipoxygenase in Dogs with Chronic Enteropathies.** *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2014; 28:1684–1691.

EBERHART, C. E.; COFFEY, R. J.; RADHIKA, A.; GIARDELLO, F. M.; FERRENBACH, S. DUBOIS, R. N. **Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human collateral adenomas and adenocarcinomas.** *Gastroenterology*, Philadelphia, v. 107, p. 1183-88, 1994.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. **Assessment of histological grade.** In: **Systemic Pathology—the Breast.** 3rd. ed. London: Churchill and Livingstone, 1998. p. 365–384.

FORREST, L.J. (2007). **Diagnostic Imaging in Oncology.** In Vail, D.M. Withrow, S.J. (Eds). *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology.* (4th Ed.). (pp. 97-109). Missouri: Saunders Elsevier.

FORREST, L.J. LIPTAK, J.M. (2007). **Soft Tissue Sarcomas.** In Vail, D. Withrow, S. (Eds.), *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology.* (4th Ed.). (pp. 425-449). Missouri: Saunders Elsevier.

FOSSLIEN, E. (2001). "Review: molecular pathology of cyclooxygenase-2 in cancer-induced angiogenesis." *Ann Clin Lab Sci* 31(4): 325-348.

FOSSUM, T.W.; CHERYL, S.H.; **Cirurgia da Cavidade Abdominal- Doenças Específicas.** In **Cirurgia de Pequenos Animais.** 4ª Edição. Editora Elsevier, cap.18 e 19, pág. 317-322-443-507, 2014.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Introdução à histologia e técnicas básicas de Histologia**. In: GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. Tratado de histologia 21 em cores.2003

GASPARINI, G.; LONGO, R.; SARMIENTO, R.; MORABITO, A. **Inhibitors of cylooxygenase 2: a new class of anticancer agents?** The Lancet Oncology, v.4, p.605-615, 2003

GAYNOR, J. S. **Control of cancer pain in veterinary patients**. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, v. 38, n. 6, p.1429-1448, 2008

GERMAN AJ, HALL EJ, Day MJ. **Chronic intestinal inflammation and intestinal disease in dogs**. J Vet Intern Med 2003; 17:8–20.

GOMES, R. G.; LACERDA, A. M. D.; SILVA, E. C.; RODRIGUES, D. M.; DAGLI, M. L. Z.; TORRES, L. N.XXIII Semana do VPT XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamim Eurico Malucelli 8 a 10 de outubro de 2014. **Diagnóstico diferencial de neoplasia maligna de células redondas intestinal em cão (Canis lupus familiaris)**, Brasil, pág.10, 2014.

HALL EJ, GERMAN AJ. **Diseases of the small intestine**. In:Ettinger SJ, Feldman EC, eds. Textbook of Veterinary Internal Medicine, 6th ed. St. Louis, MO: Elsevier Saunders; 2005:1332–1378.2. Allensprach K, Wieland B, Grone A, Gaschen F. Chroni.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A., **The hallmarks of cancer**. *Cell*, v. 100, p. 57-70, 2011.

HEAD, K.W.; ELSE, R.W.; DUBIELZIG, R.R. **Tumors of the alimentary tract**. In: MEUTEN, D.J. (Ed.). Tumors in domestic animals. 4. ed. AMES: [Wiley], 2002. P.426-430.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; SHOFER, F. S.; SMITH, A.; SOREMO, K. U. **Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma**. Veterinary Pathology, v.42, n.6, p.776-780, 2005

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia Básica** - Texto & Atlas, 13ª edição. Guanabara Koogan, p.542, 2017.

KEALLY, J. K.; McALLISTER, H.; **Radiografia e Ultra-sonografia do Cão e do Gato**. 3ª Edição. São Paulo: Manole, p.76, 2005.

KELLI, E.; BOUCHOUCHA, M.; DEVROEDE, G.; CARNOT, F.; OHRANT, T.; CUGNENC, PH.; **Diversion-related experimental colitis in rats. Colun Rectum**. 1997; 40(2):222-8.

KLIMP, A. H.; HOLLEMA, H.; KEMPINGA, C.; ZEE, A. G. V.; VRIES, E. G. E.; DAEMEN, T. **Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in human ovarian tumors and tumor-associated macrophages**. Cancer Research, v. 61, n.1, p.7305 – 7309, 2001.

KNOTTENBELT, C.; MELLOR, D.; NIXON, C.; THOMPSON, H.; ARGYLE, D. J. **Cohort study of COX-1 and COX-2 expression in canine rectal and bladder tumors**. Journal of the Small Animal Practice, v. 47, n. 4, p. 196-200, 2006.

KUTCHERA, W.; JONES, D. A.; MATSUNAMI, N.; GRODEN, J.; MCINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; WHITE, R. L.; PRESCOTT, S. M. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 4816-4820, 1996.

LEANDRO, R.M. **Estudo clínico, epidemiológico, anatomopatológico, e imunohistoquímico das neoplasias gastrointestinais em cães**. 175 f. Dissertação- (Mestrado em Ciências). Faculdade Medicina Veterinária e Zootecnia- São Paulo, 2010.

MARGULIS, V.; SHARIAT, S.F.; ASHFAQ, R.; THOMPSON, M.; SAGALOWSKY, A.I.; HSIEH, J.T.; LOTAN, Y. **Expression of Cyclooxygenase-2 in Normal Urothelium and Superficial and Advanced Transitional Cell Carcinoma of Bladder**. The Journal of Urology, v.177, p.1163-1168, 2007

MEADE, E.A.; SMITH, W.L.; DEWITT, D.L. **Pharmacology of prostaglandin endoperoxidase synthase isozymes-1 e -2**. Ann NY Acad Sci. 1994:714:136-42.

MELLO, R.O.; SILVA, C.M.; FONTE, F.P.; SILVA, D.L.F.; PEREIRA, J.A.; MARGARIDO, N.F.; MARTINEZ, C.A.R.; **Avaliação do número de células calciformes nas criptas da mucosa colônica com e sem trânsito intestinal**. Revista Colégio Brasileiro de Cirurgia (periódico na internet) 2012;39(2).

MEUTEN. D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 5ª edição. Iowa: John Wiley e Sons Inc. p.997, 2017.

MIYASHITA, M.; MAKINO, H.; KATSUTA, M.; NOMURA, T.; SHINJI, S.; KASHIWABARA, M.; TAKAHASHI, K.; KUDO, M.; ISHIWATA, T.; NAITO, Z.; TAJIRI, T. **Cyclo-oxygenase-2 over-expression is associated with human esophageal squamous cell carcinoma**. Journal Nippon Medical School, v.73, n. 6, p. 308-313, 2006.

MYERS B.M. FREDENBURGH, J.L.; GRIZZLE, W.E. Carbohydrates. In: BANCROFT, J.D.; GAMBLE, M. Theory and practice of histological techniques. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. Cap.11, p.161-187

MILANTA, F.; CITTI, S.; SANTA, D.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 (2006) 98: 115–120.

MURO, L.F.F.; AZEVEDO, F.F.; MARQUES, M.E.O.; BORALLI, I.C.; BOTTURA, C.R.P.; FAGUNDES, E.S.; PEREIRA, D.M. **Locais de Atuação dos AINE's Cox2 Seletivo** REVISTA CIENTÍFICA ELETÔNICA DE MEDICINA VETERINÁRIA – ISSN: 1679-7353. Ano VI – Número 11 – Julho de 2008 – Periódicos Semestral

NETTO, A.P.D.; MOREIRA, J.C.M.; DIAS, A.X.O.; ARBILLA, G; OLIVEIRA, S.A.; FERREIRA, L.F.; BARECK, J.; **AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO HUMANA POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) E SEUS DERIVADOS NITRADOS**, 1999.

NYLAND, T.G.; MATOON, J.S.; **Ultra-som diagnóstico em Pequenos Animais.** 2ª Edição, São Paulo: Roca, cap.11, p.211-235, 2005.

PESTILI DE ALMEIDA, E. M.; PICHÉ, C.; SIROIS, J.; DORÉ, M. **Expression of cyclo-oxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs.** Journal of Histochemistry & Cytochemistry, v. 49, n. 7, p. 867-875, 2001.

PIVA, J.A.A.C.; RANIERO, L. J.; OKAMURA, H.; LIMA, C.S.P.; ARISAWA, E.A.L.; COY, C.S.R.; **Estudo morfológico e bioquímico de tecido de cólon humano normal, adenoma e adenocarcinoma por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier.** 2011

RAMOS, R.S.; VOLPATO, R.; LOPES, M.D. **A contribuição na terapia com coxibes na oncologia de pequenos animais.** Veterinária e Zootecnia. 2010. 17(4):461-468.

Richter, K.P. (2008). **Diseases that affect more than one organ of the gastrointestinal tract.** In: M.J. Steiner (Ed.), Small Animal Gastroenterology (1.ª Ed., pp. 307-351). Hanôver, Alemanha: Schlütersche.

ROZA. M.R.; OLIVEIRA, A.L.de A.; De NARDI, A.B.; SILVA, R.L.M. **Dia a Dia.Tópicos selecionados em especialidades veterinárias.**1ª Edição. Curitiba: Medvep, 2014, 1ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 19, p.322-326, 2008.

SANTOS, R.L.; ALESSI, A.C.; **Patologia Veterinária,** 2ª Edição. São Paulo: Roca, cap. 3, p 87-180, 2016.

SELTING, K.A. **Intestinal Tumor.** In WITHROW, S.J. et al. Small animal clinical oncology. 5. ed. Missouri: Elsevier, 2013. 412p.

SHEEHAN, K.M.; STELE, C.; O'GRADY, A.; LEADER, M. B.; MURRAY, F.E.; KAY, E.W. **Association between cyclooxygenase-2 expressing macrophages, ulceration and microvessel density in colorectal cancer.** Histopathology, v.46, p. 287 – 295, 2005.

SIMMONS, D. L., BOTTING, R. M. e Hla, T. (2004). "**Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition.**" *Pharmacol Rev* 56(3): 387-437.

SOBRAL, R.A.; HONDA, S.T.; KATAYAMA, M.L.H. et al. **Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer.** *Acta Vet. Scand.*, v.50, p.27, 2008

SUBBARAMAIAH, K.; DANNENBERG, J. A. **Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment.** *TRENDS in Pharmacological Sciences.* v. 24 n. 2, p.96-102, 2003.

SUM, S.; WARD, C.R. (2009). **Flexible endoscopy in small animals.** *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 39(5), 881-902.

QUEIROGA, F. L.; PEREZ-ALENZA, M. D.; SILVAN, G.; PENA, L.; LOPES, C.; ILLERA, J. C. **Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance.** *Anticancer Research*, v. 25, n. 6B, p. 4269-4275, 2005.

TAKATORI, H.; NATSUGOE, S.; OKUMURA, H.; MATSUMOTO, M.; UCHIKADO, Y.; et al. **Cyclooxygenase-2 expression is related to prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma.** *European Journal of Surgical Oncology*, p.1-6, 2007

TSUJII, M.; KAWANO, S; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. **Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells.** *Cell*, v. 93, p. 705-716, 1998.

TURINI, M.E.; DUBOIS, R.N.; **Cycloxygenase-2: a therapeutic target.** *Annu Rev.Med* 2002; 53:35-57.

WANG, W.; DUBOIS, R. N. **Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch.** Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America, v.101, n. 2, p. 415-416, 2004.

WITHROW, S.J. (2007a). **Cancer of the Gastrointestinal Tract.** In Vail, D.M. Withrow, S.J. (Eds). *Withrow and Macewen's small animal clinical oncology.* (4th Ed.). (pp. 476-482).Missouri: Saunders Elsevier.

WOLFESBERGER, B.; WALTER, I.; HOELZL, C.; THALHAMMER, J. G.; EGERBACHER, M. **Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells.** Research in Veterinary Science, v. 80, n. 3, p. 308-316, 2006.