

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

**SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO
SUBMETIDAS À MASTECTOMIA ACOMPANHADA OU NÃO
DA ADMINISTRAÇÃO DE CARPROFENO**

**Bruna Fernanda Firmo
Médica Veterinária**

2020

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

**SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO
SUBMETIDAS À MASTECTOMIA ACOMPANHADA OU NÃO
DA ADMINISTRAÇÃO DE CARPROFENO**

Bruna Fernanda Firmo

Orientador: Prof. Dr. Andrigo Barboza De Nardi

Coorientador: Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali

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

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

F525s Firmo, Bruna Fernanda

Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno / Bruna Fernanda Firmo. -- Jaboticabal, 2020

70 p. : fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Andriago Barboza De Nardi
Coorientador: Geovanni Dantas Cassali

1. Câncer. 2. Oncologia. 3. Agentes antiinflamatórios não esteróides. 4. Agentes anti-inflamatórios. 5. Mamas Câncer. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMAS MAMÁRIO SUBMETIDAS À MASTECTOMIA ACOMPANHADA OU NÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARPROFENO

AUTORA: BRUNA FERNANDA FIRMO

ORIENTADOR: ANDRIGO BARBOZA DE NARDI

COORIENTADOR: GEOVANNI DANTAS CASSALI

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

Prof. Dr. ANDRIGO BARBOZA DE NARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Prof. Dr. RAFAEL RICARDO HUPPES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNICESUMAR - Maringá/PR
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Profa. Dra. GIOVANNA ROSSI VARALLO
Centro Universitário do Centro Norte-UNORP / São José do Rio Preto/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

P/ Profa. Dra. LIZANDRA AMOROSO
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)

Andrigo Barboza de Nardi

Jaboticabal, 01 de setembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

BRUNA FERNANDA FIRMO – nascida no dia 19 de outubro de 1989, natural de Jundiaí – SP. Graduada no curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu (2008-2012). Durante a graduação, desenvolveu: dois projetos de iniciação científica, sob orientação do Prof. José Ricardo de Carvalho, na área de anatomia, e da Profa. Noeme Sousa Rocha, na área de patologia veterinária; Desenvolveu projeto de extensão sob orientação do Prof. Stelio Pacca Loureiro Luna; foi representante discente do conselho do Departamento de Cirurgia Veterinária da FMVZ – UNESP – Câmpus de Botucatu; membro da diretoria, vice-presidente e presidente do Grupo de Estudos em Pequenos Animais (GEPA); um dos cursos organizados durante a graduação recebeu prêmio de melhor curso, durante a XXV Semana de Estudos Agropecuários e Florestais de Botucatu (SEAB); embaixadora do Projeto Universidades PremierPet (2009-2011), recebeu prêmio de embaixadora suprema (2011). Especialização em Oncologia Veterinária pelo Instituto Bioethicus (2012-2014), recebeu título de melhor aluna (2014). Residente em Cirurgia de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP - Botucatu (2013-2015), sendo representante discente da congregação da FMVZ – UNESP – Câmpus de Botucatu. Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária – FCAV – UNESP de Jaboticabal (2015 – 2016), sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Em um dos trabalhos apresentados durante o período, recebeu prêmio de 2º melhor trabalho científico no III Curso e I Simpósio Internacional de Cirurgia Reconstructiva em Cães e Gatos (2015). Aprovada pelo Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Veterinária – FCAV/UNESP de Jaboticabal (2016), para o doutorado, sob orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Palestras e aulas foram ministradas, durante o período de residência, mestrado, e doutorado, abordando temas relacionados às áreas de Cirurgia de Pequenos Animais e de Oncologia Veterinária. Participou do atendimento no Serviço de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi. Foi “Visiting Scholar” na University of North Carolina em Chapel Hill (Carolina do Norte - Estados Unidos) financiada pelo Programa de Doutorado Sanduíche (PDSE/CAPES), orientada pelo Prof. Stephen D. Hursting.

EPÍGRAFE

“Você não consegue ligar os pontos olhando para frente; você só consegue ligá-los olhando para trás. Então você tem que confiar que os pontos se ligarão algum dia no futuro. Você tem que confiar em algo – seu instinto, destino, vida, carma, o que for. Esta abordagem nunca me desapontou, e fez toda diferença na minha vida.”

-Steve Jobs

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que tornaram possível sua realização, apesar das dificuldades no caminho. Além disso, tornaram essa fase prazerosa e motivadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de evoluir e pela força conferida a mim para suportar todas as dificuldades encontradas nessa estrada da vida.

À minha família, meu namorado Thiago Henrique Cozzi e aos meus filhos de quatro patas, Sofia e Sheep.

Aos professores da faculdade e da vida, que me ensinaram o que eu sei hoje. Profissionalmente desde a graduação em Botucatu, cada professor com sua contribuição singular, e os diversos profissionais que conheci pelo Brasil durante os estágios obrigatórios e extracurriculares. Em especial ao Prof. Bruno Watanabe Minto, por me apresentar a Cirurgia Veterinária e guiar meus passos e me apresentar ao meu atual orientador. Pessoalmente, as pessoas que conheci que mudaram minha vida, vieram na forma de colegas de turma e de trabalho, estagiários, professores, entre outros, e tem um lugar cativo em meu coração.

Aos professores, colegas e amigos do Serviço de Oncologia Veterinária (SOV). Todos que me apoiaram nos momentos de dificuldades e transmitiram sem restrições seus conhecimentos durante a rotina e discussões clínicas.

Ao Serviço de Obstetrícia, aos professores, às residentes e aos funcionários, que não mediram esforços para abarcar o projeto e torná-lo possível.

À Profa. Marília Gabriele Prado Albuquerque Ferreira e ao Prof. Antonio Sergio Ferraud pelo auxílio na análise estatística do projeto.

À todos os envolvidos no Hospital Veterinário Governador Laudo Natel da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), funcionários, técnicos, residentes, pós-graduandos e professores pela oportunidade de trabalhar em equipe e aprender diariamente.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), que tanto em Botucatu quanto em Jaboticabal tornaram-se um pedaço da minha casa, sendo minha segunda e terceira casa.

Aos amigos, colegas de trabalho e professores incríveis que tive a oportunidade de conhecer durante o “doutorado sanduiche” na University of North Carolina em Chapel Hill (Carolina do Norte - Estados Unidos), a qual foi minha quarta casa, sendo todos os que participaram dessa experiência paciente e acolhedor durante 6 meses do período de meu doutorado. Agradeço também todos os envolvidos pela minha experiência no exterior: Primeiramente o Dr. Lucas Campos de Sá Rodrigues, o qual foi fundamental para me encaminhar à universidade e proporcionou a equipe de projeto no qual eu fiz parte; o meu orientador no exterior, Prof. Stephen David Hursting, o qual não mediu esforços para proporcionar estrutura e material do projeto de pesquisa, além do acolhimento no departamento; a Dra. Barbara J. Davis, a qual não mediu esforços para dar suporte ao projeto de pesquisa; o Michael Francis Coleman, o qual deu todo suporte e parceria para me qualificar para executar o projeto de pesquisa; a Erika T. Rezeli, a qual deu todo suporte possível para auxiliar minhas obrigações perante ao laboratório, ao departamento e à universidade; a toda equipe de laboratório, o qual me fizeram sentir acolhida desde o primeiro dia ao último.

Ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV da UNESP – Câmpus de Jaboticabal, por ter me acolhido nesta etapa da minha vida profissional. Em especial aos funcionários da Seção de Pós-graduação Diego Henrique Mafrá pela eficiência, auxílio e paciência durante todo o período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, o qual financiou minha bolsa de doutorado no país e através do Programa de Doutorado Sanduíche (PDSE/CAPES), financiou minha bolsa durante meu período no exterior durante o doutorado.

À Professora Paola Castro Moraes e a Professor André de Mattos Faro pela contribuição feita no momento do exame geral de qualificação. Assim como ao Prof. Dr. Rafael Ricardo Huppes, Profa. Dra. Giovanna Rossi Varallo, Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto e a Profa. Ass. Dra. Lizandra Amoroso pela preciosa avaliação e contribuição realizada no momento da defesa da tese de doutorado.

Ao meu co-orientador, o Professor Geovanni Dantas Cassali, por todo auxílio dado a mim e ao projeto.

Ao meu orientador, o Professor Andriago Barboza De Nardi, pela orientação, por ter confiado e me incentivado mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pela paciência, compreensão, amizade e ensinamentos.

À todos que de alguma forma contribuíram para que eu ingressasse nesta nova etapa e para que eu a concluísse.

Por fim, agradeço ao Ronald Glanzmann e Alexandre Bragard, por confiarem em mim e darem oportunidade a mim quando precisei.

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)	ii
FORMA DE APRESENTAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE QUADROS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
CAPITULO 1 - Considerações gerais	1
Introdução	2
Objetivo	2
Bioquímica da cicloxigenase-2 (COX-2) na atividade oncogênica	2
Revisão de literatura dos neoplasmas mamários	5
Aspectos gerais	5
Cicloxigenase-2 (COX-2)	6
Apresentação clínica	7
Fatores de risco	8
Fatores prognósticos e preditivos	11
Diagnóstico	15
Estadiamento	16
Tratamento	16
Prognóstico	21
Recomendações	21
Referências	21
CAPITULO 2 – Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno	31
Resumo	31
Introdução	32
Material e Métodos	33
Resultados	34
Discussão	39
Conclusão.....	44
Referências	44
APÊNDICE	49
Apêndice A	50
Apêndice B.....	52
Apêndice C	53

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL (CEUA)




CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Sobrevida de cadelas com carcinomas mamário submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno”, protocolo nº 1589/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Andrigo Barboza de Nardi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 02 de fevereiro de 2017.

Vigência do Projeto	01/03/2017 a 30/04/2019
Espécie / Linhagem	Canina (Cão)
Nº de animais	20
Peso / Idade	15 kg
Sexo	Fêmeas
Origem	Rotina do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" – FCAV-Unesp.

Jaboticabal, 02 de fevereiro de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

FORMA DE APRESENTAÇÃO DA TESE DE DOUTORADO

Seguindo as orientações das normas para elaboração de dissertação e tese dos programas de pós graduação, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP.

De acordo com a normatização (item 1.3.2.2, página 12-15), a apresentação foi organizada na forma de capítulos.

SOBREVIDA DE CADELAS COM CARCINOMA MAMÁRIO SUBMETIDAS À MASTECTOMIA ACOMPANHADA OU NÃO DA ADMINISTRAÇÃO DE CARPROFENO.

RESUMO – Mecanismos associados à promoção tumoral, como aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e ocorrência de metástases, têm sido propostos para explicar as consequências da super expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) nas células neoplásicas. Em virtude da relação da COX-2 com o desenvolvimento do câncer, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevida de cadelas com carcinoma mamário, em estadiamento avançado (T3N0-1M0), submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno, bem como a tolerância ao tratamento. Para a realização deste estudo foram selecionadas 20 cadelas com carcinoma mamário, em estágio III e IV, provenientes da rotina do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Em 6 meses de acompanhamento, no grupo controle foram observados dois óbitos, os quais tiveram tempo de sobrevida de 110 e 178 dias, enquanto no grupo tratado, foram observados dois óbitos, os quais tiveram tempo de sobrevida de 87 e 133 dias. Em relação ao tempo livre de doença, observou-se surgimento de nódulos em outros órgãos, no grupo controle em cinco pacientes, sendo com 60 (na pele), 150 (no fígado e nos pulmões) e 180 dias (no baço, fígado e linfonodo esternal cranial), enquanto no grupo tratado em três pacientes, sendo com 60 (na pele), 90 (no pulmão), 120 (no baço), e 180 dias (no pulmão). As pacientes apresentaram 79 nódulos mamários, entre os quais foram observados 100 diagnósticos histopatológicos (variando de 1 a 11 por paciente). A expressão geral de COX-2 foi de 70% (grupo controle = 80% e grupo tratado = 60%; estadiamento IV = 100% e estadiamento III = 50%). Pela análise de correspondência múltipla, houve associação entre pacientes que apresentaram carcinoma grau I e ausência de expressão de COX-2 ($p=1$). Pacientes que apresentaram sobrevida entre 6 e 12 meses foram associadas àquelas com a apresentação de nódulo único e com tumores de índice mitótico intermediário (entre 9 e 16 figuras de mitose em 10 CGA) ($p=1$). Pelo teste qui-quadrado, observou-se que o parâmetro índice mitótico analisado no exame histopatológico pode ser capaz de segregar grupos de sobrevida ($p=0,06$). nenhuma paciente teve efeitos colaterais graves, os quais indicassem a interrupção do tratamento. A expressão de COX-2 identificada na maioria das pacientes (70%) suporta a indicação da terapia anti-inflamatória em neoplasmas mamários caninos. A incorporação de biomarcadores na tomada de decisão clínica é cada vez mais importante na oncologia veterinária, para praticar a terapia individualizada, e assim, prever os pacientes que irão ou não responder ao tratamento. Além disso, o uso do carprofeno foi seguro para a utilização por períodos prolongados (90 dias) em cães.

Palavras-chave: câncer, cicloxigenase, oncologia, neoplasias mamárias, tratamento, sobrevida.

SURVIVAL OF BITCHES WITH MAMMARY CARCINOMA UNDERGOING MASTECTOMY WITH OR WITHOUT CARPROFEN TREATMENT

ABSTRACT – Mechanisms associated with tumor promotion such as increased angiogenesis, inhibition of apoptosis, modulation of the immune response, increased invasiveness, and metastasis have been proposed to explain consequences of the overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in neoplastic cells. Due to the relationship between COX-2 and the development of cancer, the goal of this study was to evaluate survival of bitches with mammary carcinomas in advanced stage (T3N0-1M0) submitted to mastectomy with or without carprofen administration, as well the tolerance of the treatment. For this study, 20 female dogs with stage III and IV mammary carcinoma were selected from the routine of the Veterinary Hospital "Governador Laudo Natel" of the Faculty of Agrarian and Veterinary Sciences of the Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. In 6 months of follow-up, two deaths were observed in the control group, which had a survival time of 110 and 178 days, while in the treated group, two deaths were observed, which had a survival time of 87 and 133 days. Regarding disease-free time, nodules on organs were observed in the control group in five patients, with 60 (on the skin), 150 (in the liver and lungs), and 180 days (in the spleen, liver and cranial sternal lymph node), while in the group treated were observed in three patients, with 60 (on skin), 90 (in the lungs), 120 (in the spleen), and 180 days (in the lung). The patients had 79 nodules, among which 100 histopathological diagnoses (ranging from 1 to 11 per patient). The general expression of COX-2 was 70% (control group = 80% and treated group = 60%; stage IV = 100% and stage III = 50%). By the multiple correspondence analysis, there was an association between patients whose presented grade I carcinoma with absence of COX-2 expression ($p = 1$). Patients whose performed survival between 6 and 12 months were associated with those which presentation of a single nodule and those with tumors of intermediate mitotic index (among 9 and 16 mitosis figures in 10 CGA) ($p = 1$). By the chi-square test, it was observed that the mitotic index parameter analyzed in the histopathological exam may be able to segregate survival groups ($p = 0.06$). No patient had serious side effects, which indicated the interruption of treatment. COX-2 expression identified in most patients (70%) supports the indication of anti-inflammatory therapy in canine mammary carcinoma. The inclusion of biomarkers in clinical decision-making is increasingly important in veterinary oncology to practice individualized therapy, and thus, predict patients whose will respond to treatment or will not. In addition, the use of carprofen was safe for use for prolonged periods (90 days) in dogs.

Keywords: cancer, cyclooxygenase, oncology, breast neoplasms, treatment, survival.

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Dados obtidos das alterações clínicas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado.	36
Quadro 2. Dados obtidos das alterações laboratoriais das pacientes do grupo controle e do grupo tratado.	36
Quadro 3. Dados obtidos das ultrassonográficas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado.	37
Quadro 4. Dados obtidos das alterações radiográficas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Percentual dos tipos histológicos diagnosticados na amostra avaliada em pacientes fêmeas da espécie canina. UNESP–Câmpus de Jaboticabal (2020).	38
Figura 2. Expressão de COX-2 em neoplasmas mamários em cadelas. A: Ausência de imunexpressão de COX-2 nas células neoplásicas epiteliais. B: Imunexpressão de COX-2 nas células neoplásicas epiteliais.	38
Figura 3. Categorias avaliadas na análise de correspondência múltipla. Surgery_G = Grupo controle (cirurgia); Carprofen_G = Grupo tratado (carprofeno); S = estadiamento clínico; LW = Exames laboratoriais; CS = sinais clínicos; DI = exames de imagem; yrs = anos; SNG_tumor = tumor único; MTP_Tumor = múltiplos tumores; U_YES = tumor ulcerado; U_No = tumor não ulcerado; DHC=diferentes diagnósticos histopatológicos; SHC = único diagnóstico histopatológico;G = grau histológico; STC = tipo especial de carcinoma; COX_Neg = COX-2 negativo; COX_Pos = COX-2 positivo; C_Margins = Margens cirúrgicas livres; I_Margins = Margens cirúrgicas comprometidas; ST = tempo de sobrevida.	39

CAPITULO 1 - Considerações gerais

1. Introdução

A incidência do câncer está aumentando consideravelmente em cães e gatos, sendo atualmente, uma das principais causas de óbito dos animais de companhia (Rodaski e Piekarz, 2009). Além disso, a palavra “câncer” em animais de estimação foi associada à morte e eutanásia. Atualmente, o convívio do tutor com seus pets está cada vez mais valorizado, tornando os tutores dispostos a investir todo esforço necessário para aumentar a sobrevida e qualidade de vida do seu cão ou gato com câncer (De Nardi, 2007).

Em cadelas, o processo neoplásico mais frequente é o tumor mamário (Alenza et al., 2000; Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005; Stratmann et al., 2008; Oliveira Filho et al., 2010; Cassali et al., 2014). Devido à elevada incidência, seu estudo vem crescendo em relação a outras afecções (De Nardi et al., 2009).

Os neoplasmas mamários podem ser prevenidos pela realização da castração precoce (antes de dois anos e meio de idade). Tumores mamários diagnosticados no Brasil representam entre 68,4% a 90,9% dos neoplasmas mamários em cadelas (De Nardi et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Oliveira Filho et al., 2010; Priebe et al., 2011; Toríbio et al., 2012; Brito et al., 2013). A apresentação clínica é variável em seu tamanho, forma, consistência, mobilidade, presença de ulceração e tempo de evolução (De Nardi et al., 2009). Em 25 a 50% dos casos, as pacientes apresentam metástases no momento do diagnóstico, contribuindo desta forma para que o câncer de mama torne-se uma das principais causas de morte de cadelas idosas (Lana et al., 2007). A sobrevida global de dois anos foi relatada entre 25% e 40% dos casos de tumores mamários caninos, entretanto, essa porcentagem pode ter sido influenciada por vários fatores e variar dependendo do tipo histológico e do grau de diferenciação, do estágio da doença e do tratamento empregado (Sorenmo, 2003).

A realização de novos trabalhos pode contribuir para o melhor entendimento da fisiopatologia desta afecção, fornecendo subsídios para o seu tratamento, como emprego de fármacos inibidores seletivos da cicloxigenase-2 (COX-2) no tratamento do câncer de mama em cadelas, visando a obtenção de um melhor prognóstico.

Além disso, os neoplasmas mamários em cadelas são modelos apropriados e válidos ao estudo da biologia do câncer de mama em mulheres, de tal forma que, permite o teste de novos agentes terapêuticos para ambas as espécies (Zuccari, 2001). Sendo assim, descobertas em Medicina Veterinária podem ser úteis no tratamento de mulheres com câncer de mama. Em humanos, esse neoplasma é o segundo mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil no ano de 2020 será de 66.280 (29,7%), estimado para cada 100 mil mulheres (INCA, 2020).

1.1. Objetivo

Este trabalho teve por objetivo avaliar a sobrevivência de cadelas com carcinomas mamários, de ocorrência natural, em estágio III e IV, submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno. Adicionalmente, a tolerância do tratamento do grupo tratado foi avaliado.

Adicionalmente, objetivou-se quantificar a expressão da ciclooxigenase-2 em cadelas com carcinomas de mama, estágio III e IV, correlacionando a sua expressão com o objetivo geral.

2. Bioquímica da ciclooxigenase-2 (COX-2) na atividade oncogênica

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico compõem um conjunto de mediadores que modulam a resposta inflamatória e imunológica e decorrem da sua oxidação, o qual é gerado pela ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolipídios da membrana celular (Wang et al., 2006; Souza et al., 2009). A oxidação do ácido araquidônico pode ser realizada por duas vias enzimáticas: ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX). A ação do sistema enzimático da COX sobre os fosfolipídios de membrana converte o ácido araquidônico em uma prostaglandina endoperóxida estável (PGG₂), que é subsequentemente reduzida para PGH₂, a qual pode ser utilizada como substrato para sintetizar prostaglandinas (PGE₂, PGD₂ e PGF₂α). A PGH₂ pode ainda ser convertida em prostaciclina (PGI₂) ou tromboxano (TXA₂) (Calderón, 2005; Wang et al., 2006; Souza et al., 2009).

Sabe-se que há pelo menos dois tipos de COX que exercem no organismo diferentes funções fisiológicas: a cicloxigenase-1 (COX-1) e a cicloxigenase-2 (COX-2) (Wang et al., 2006; Souza et al., 2009; Queiroga et al., 2010).

A COX-1 encontra-se expressa em vários tecidos e é essencial no organismo, pois está envolvida na produção de prostaglandinas, que modulam funções fisiológicas em diversos órgãos, incluindo rins, trato gastrointestinal e na atividade das plaquetas (Wang et al., 2006; Joubert, 2009).

Em contraste, a COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos, entretanto, pode ser expressa em resposta a estímulos, como presença de citocinas (interleucina-1 e fator de necrose tumoral), fatores de crescimento (fator de crescimento epidermal – EGF e fator de crescimento de fibroblastos - FGF), lipopolissacarídeo bacteriano e oncogenes (Pires et al., 2010; Queiroga et al., 2010).

O desenvolvimento e progressão tumoral tem sido relacionados com a presença da COX-2 nas células tumorais humanas (Beam et al., 2003). A correlação entre COX-2 e o câncer emergiu a partir de estudos que estabeleceram o uso crônico de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e a diminuição da incidência do carcinoma de colo, em meados dos anos noventa (Giovannucci et al., 1994; Giardiello et al., 1995).

A expressão da COX-2 auxilia em mecanismos associados à promoção tumoral, como aumento da angiogênese e proliferação celular, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase, têm sido propostos, baseados em estudos experimentais, para explicar as conseqüências da super expressão de COX-2 (De Nardi et al., 2007; Lavallo et al., 2009; De Nardi et al., 2011; Lavallo et al., 2012). Desse modo, a super expressão da COX-2 em tumores tem sido vinculada com prognóstico ruim e com neoplasmas mais agressivos, especialmente em relação aos carcinomas (Lascelles, 2007). Estudos em medicina veterinária demonstraram aumento na expressão de COX-2 em diversos neoplasmas caninos, como neoplasmas intestinais (Mcentee et al., 2002), ovarianas (Borzacchiello et al., 2007), prostáticas (L'eplattenier et al., 2007), de glândula mamária (De Nardi et al., 2007, Dias Pereira et al., 2009, Lavallo et al., 2009, Queiroga et al., 2010), da cavidade nasal (Impellizeri e Esplin, 2008) e da cavidade oral (Pires et al., 2010).

Após serem utilizados no tratamento da inflamação, febre e dor, os inibidores da COX-2 estão sendo desenvolvidos como potenciais agentes para a prevenção e tratamento do câncer em humanos e animais (Lascelles, 2007). Giovannucci et al. (1994) demonstraram diminuição em 40 a 50% do risco de desenvolvimento de câncer de cólon e reto em pessoas que usavam regularmente aspirina ou outro anti-inflamatório não esteroide. Os ensaios clínicos de Giardiello et al. (1995) com AINE em pacientes com pólipos adenomatosos evidenciaram claramente que o tratamento com estes medicamentos promove a regressão dos adenomas pré-existentes.

Esses estudos na espécie canina (Mcentee et al., 2002; Borzacchiello et al., 2007; De Nardi et al., 2007; Lascelles, 2007; L'eplattenier et al., 2007; Impellizeri e Esplin, 2008; Dias Pereira et al., 2009; Lavallo et al., 2009; Pires et al., 2010; Queiroga et al., 2010) comprovaram o papel da COX-2 na patogênese do câncer e sugerem que sua inibição programada, com o uso de AINEs inibidores seletivos de COX-2, pode ser efetiva no tratamento do câncer, assim como observado em humanos anteriormente.

Os AINEs tradicionais são inibidores não-seletivos de ambas as COX (COX-1 e COX-2), enquanto uma nova classe de AINE, é inibidor seletivo da COX-2, a qual foi desenvolvido para atuar no controle da inflamação poupando a ação protetora da COX-1, evitando assim os efeitos adversos no trato gastrointestinal, na função renal e plaquetária (Grösch et al., 2006).

Nas células neoplásicas, os AINEs seletivos da COX-2 apresentam ação contra o câncer pela capacidade de inibir a angiogênese, reduzir a proliferação e invasão tumoral, aumentar a taxa de apoptose, além de estimular o sistema imune localmente contra a presença do neoplasma (Souza et al, 2009). Essa classe de medicamento desenvolvido para uso em Medicina Veterinária está sendo muito estudada no tratamento dos neoplasmas que ocorrem em cães e gatos, principalmente pela alta seletividade destas moléculas sobre a COX-2. Apresentam efeito antitumoral mais potente que os AINEs tradicionais (não seletivos) e nível de segurança muito maior em relação ao desencadeamento de efeitos colaterais (Guérius et al., 2002). As estratégias de tratamento que utilizam a inibição da COX-2 têm demonstrado ação preventiva e terapêutica em modelos animais com câncer espontâneo e experimental (Rossmeisl et al., 2009).

O carprofeno é um ácido carboxílico conhecido como ácido aril-propionico, com características analgésicas e antipiréticas. Seu mecanismo de ação ocorre principalmente pelo efeito na liberação de prostaglandinas, e têm a capacidade de inibir seletivamente a COX-2. Sua seletividade é alternativa promissora no tratamento de cães e gatos, diminuindo seu potencial tóxico quando comparado à outras classes (Guérius et al., 2002). Possui ação tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com diversas modalidades terapêuticas, como na quimioprevenção, quimioterapia antineoplásica, radioterapia ou como terapia única (Lloret et al., 2007; Joubert, 2009; Lavalle et al., 2012).

Além disso, devido à sua inibição ser seletiva a COX-2, o carprofeno tem baixo potencial de efeitos colaterais. Segundo Luna et al. (2007), esse fármaco (4mg/kg, p.o.), administrado por 90 dias em cães, causa menos lesão no trato gastrointestinal quando comparado com outros AINES (cetoprofeno e flunixin meglumine).

3. Revisão de literatura dos neoplasmas mamários

3.1. Aspectos gerais

O câncer de mama é o neoplasma mais comum em cadelas, sendo em torno de 52% dos neoplasmas diagnosticados (Sarli et al., 2002; De Nardi et al., 2009; Ferreira et al., 2009; Oliveira Filho et al., 2010). A ovariectomia (OHE) precoce reduz a incidência deste neoplasma, pois inibe a carcinogênese influenciada pelos hormônios produzidos no ovário. Em animais submetidos à OHE antes do primeiro, entre o primeiro e o segundo e após o segundo estro até 2,5 anos de idade é de menos que 0,5%, 8%, 26%, respectivamente (Schneider et al., 1969; Morrison, 1998; De Nardi et al., 2007; Oliveira Filho et al., 2010; Cassali et al., 2014). Cadelas submetidas à OHE após os dois anos e meio de idade não são beneficiadas pelos efeitos profiláticos deste procedimento (Lana et al., 2007). Em cães machos a incidência é baixa, representada por 2,7% de todos os processos neoplásicos diagnosticados neste gênero (Alenza et al., 2000).

Estudos sobre a casuística de tumores mamários relataram a alta incidência de pacientes com neoplasmas mamários malignos diagnosticados em cadelas dos diferentes estados brasileiros, correspondendo entre 68,4% a 90,9% dos casos (De Nardi et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Oliveira Filho et al., 2010; Priebe et al., 2011; Toríbio et al., 2012; Brito et al., 2013), o que difere dos estudos internacionais, que relataram aproximadamente 50% dos casos (Allen et al., 1986; Daleck et al., 1998; Alenza et al., 2000; Morrison, 2002; Philibert et al., 2003; De Las Mulas et al., 2005; Reis et al., 2010; Sá e Repetti, 2011; Ribas et al., 2012). A idade mais frequente varia entre oito e 10 anos (Toríbio et al., 2012; Ribas et al., 2012), porém, alguns pacientes desenvolvem o tumor com menos de cinco anos de idade. Na idade precoce, os tumores benignos são mais frequentes, sendo a displasia mamária comum em cadelas jovens entre dois a quatro anos de idade (Alenza et al., 2000). A predileção racial é variável entre os estudos (Alenza et al., 2000), de acordo com a variação da distribuição racial de cada região, desta forma, no Brasil as raças mais acometidas são Poodle, Cocker Spaniel, Teckel, Pastor Alemão e Pinscher (Oliveira Filho et al., 2010).

3.2. Cicloxigenase-2 (COX-2)

O mecanismo de ação que a expressão da COX-2 desempenha nos diversos processos tumorais já foram discutidos anteriormente neste capítulo. Em resumo, a super expressão da COX-2 tem sido vinculada com prognóstico ruim e com neoplasmas mais agressivos, especialmente em relação aos carcinomas (Lascelles, 2007). A expressão de COX-2 em diversos neoplasmas caninos tem sido relatado em neoplasmas da glândula mamária, sendo que entre os tumores mamários benignos, a sua expressão varia entre 8% a 96% (Dore et al., 2003; De Nardi, 2007; Queiroga et al., 2007; Dias Pereira et al., 2009), sendo entre os tumores malignos, varia de 42% a 100% (Dore et al., 2003; Mohammed et al., 2004; Heller et al., 2005; Millanta et al., 2006; Queiroga et al., 2007; Dias Pereira et al., 2009; Lavallo et al., 2009; Queiroga et al., 2010; Clemente et al., 2013; Arenas et al., 2016).

O aumento da expressão dessa enzima em pacientes com neoplasmas mamários está relacionado à menor sobrevida em cadelas (Lavallo et al., 2009). Além

disso, De Nardi (2007) e Dias Pereira et al. (2009) constataram que a maioria das lesões metastáticas estudadas exibiam super expressão da COX-2, assim como o neoplasma mamário primária, contribuindo com a suspeita de que esta enzima possui propriedades angiogênicas e de invasão no processo metastático.

Atualmente, relatos na literatura humana (Ashok et al., 2011) e veterinária (Lloret et al., 2007) têm documentado a ação AINEs contra o câncer de mama, por meio da capacidade de inibir seletivamente a (COX-2) e, conseqüentemente, diversos mecanismos associados com o desenvolvimento deste neoplasma.

O uso dos AINEs seletivos da COX-2 tem sido empregado na oncologia pois apresentam efeito antitumoral mais potente que os AINEs tradicionais (não seletivos) e nível de segurança maior em relação aos efeitos colaterais (Guérius et al., 2002). Sua atuação seletivamente na COX-2 promove a capacidade de inibir a angiogênese, reduzir a proliferação e invasão tumoral, aumentar a taxa de apoptose, além de estimular o sistema imune localmente contra a presença do neoplasma (Souza et al, 2009). As estratégias de tratamento que utilizam a inibição da COX-2 têm sido empregadas objetivando sua ação preventiva e terapêutica em modelos animais com câncer espontâneo e experimental (Rossmeisl et al., 2009).

3.3. Apresentação clínica

A apresentação clínica dos tumores mamários é variável, pois estes se manifestam comumente na forma de nódulos circunscritos, superfície lisa ou irregular, aderidos ou não a pele ou aponeurose do músculo reto abdominal, de volume, consistência, mobilidade e quantidade variados, eles podem estar ou não associados à ulceração e inflamação (Cassali et al., 2014). As mamas com nódulos múltiplos podem apresentar tipos histológicos distintos (Alenza et al., 2000, Cassali et al., 2014). Ao corte, apresentam aspecto sólido, cístico ou misto (De Nardi et al., 2007). As glândulas mamárias abdominais caudais e inguinais são mais acometidas (Stratmann et al., 2008; Oliveira Filho et al., 2010).

O carcinoma inflamatório caracteriza-se por tumor associado à inflamação da pele ou da glândula mamária. Sua apresentação é singular, caracterizada por uma

placa firme e contínua, associada à sensibilidade dolorosa, edema, ulceração, hiperemia e hipertermia local (Cassali et al., 2014).

As metástases podem acometer tanto os linfonodos regionais quanto órgãos a distância, como os pulmões, fígado, rins, glândulas adrenais, cérebro, olhos, ossos e coração (Alenza et al., 2000; Oliveira Filho et al., 2010). Em torno de 50% das cadelas com tumores mamários malignos desenvolvem metástases (Oliveira Filho et al., 2010; Philibert et al., 2003), preferencialmente por via linfática em cadelas, mas podem ocorrer também por via hematogênica (De Nardi et al., 2009; Klopfleisch e Gruber, 2009).

3.4. Fatores de risco dos neoplasmas mamários

3.4.1. Hormônios

Atualmente está bem estabelecido o papel dos hormônios esteroides femininos (estrógeno e progesterona) na carcinogênese dos tumores mamários (Sá e Repetti, 2011). Os receptores de estrógeno e progesterona estão expressos em maior proporção nas glândulas mamárias normais e nos processos neoplásicos benignos, quando comparados aos tumores malignos e metástases de tumores mamários (Alenza et al., 2000), sendo assim, a positividade dos receptores hormonais está relacionada a menor gradação histológica do tumor (De Las Mulas et al., 2005; Ferreira et al., 2009).

Estudos relataram a redução do risco de desenvolvimento de tumor mamário com a realização da OHE precoce (até dois anos e meio de idade) (Alenza et al., 2000; De Nardi et al., 2007). Após o desenvolvimento do processo tumoral, existe divergência sobre o efeito protetor da OHE realizada no mesmo momento da remoção cirúrgica do tumor mamário, pois alguns autores não encontraram tal correlação (Allen e Mahafrey, 1989; Morris et al., 1998; Fonseca e Daleck, et al. 2000), enquanto outros sugerem efeito significativo. Um autor não comprovou estatisticamente (Misdorp, 1988) e outros autores observaram o efeito protetor em cadelas com tumores mamários não malignos (Kristiansen et al., 2013).

Fatores como a idade da primeira gestação, número de gestações e desordens do estro geram resultados divergentes na literatura, provavelmente pela influência

pouco significativa na carcinogênese dos tumores mamários (Alenza et al., 2000). A utilização de contraceptivos está associada a maior incidência de hiperplasia e neoplasmas mamários benignos quando tratadas com progesterona ou progestinas. A maior ocorrência de neoplasmas mamários malignos ocorre em cadelas tratadas com progestinas combinadas a estrógenos ou a altas doses de progesterona (Oliveira Filho et al., 2010).

Fatores de crescimento também possuem importante papel na carcinogênese mamária, incluindo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de transformação do crescimento (TGFs), proteína relacionada ao hormônio da paratireoide (Alenza et al., 2000) e hormônio de crescimento (GH) (Alenza et al., 2000; De Las Mulas et al., 2005).

3.4.2. Obesidade

Os fatores nutricionais, principalmente os que resultam em obesidade são considerados fatores de risco associados à manifestação do neoplasma mamário. A obesidade, principalmente em cadelas jovens submetidas à OHE (obesas até um ano de idade) ou até um ano antes do diagnóstico, está relacionada à maior incidência de neoplasmas mamários (Alenza et al., 1998; Philibert et al., 2003).

Além disso, a composição da dieta habitual de cadelas tem sido relacionada, sendo associado o consumo de alimento caseiro (principalmente com elevado consumo de carne vermelha) à ocorrência de neoplasmas mamários, em comparação com o alimento comercial, entretanto, sua composição não foi considerada (Alenza et al., 1998; Sirivaidoypong, 2003).

O tecido adiposo atua como uma glândula e é ativo na conversão de precursores em estradiol, senso assim, como proposto em mulheres, a obesidade possivelmente aumenta as concentrações de estrógeno e outros hormônios, como a aromatase, leptina e o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), o que ocasiona aumento da atividade proliferativa do epitélio mamário (Philibert et al., 2003).

Além disso, cães idosos apresentam evidências do estado inflamatório de seu organismo, assim como cães obesos. O estado pró inflamatório é caracterizado, de forma geral, pelo aumento de marcadores inflamatórios como fator de necrose tumoral

alfa (TNF-alfa), interleucinas (IL-6, IL1beta) e proteína C reativa (PCR) e pela diminuição das células T CD8+ quando comparado a cães saudáveis (Panickar e Jewell, 2015). O estresse oxidativo, por sua vez, é uma condição em que ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em virtude da morte celular induzida pelo estresse oxidativo exacerbado e pelo processo inflamatório crônico, doenças crônicas podem se desenvolver, como o câncer, inclusive em cães (Lorke et al., 2020).

3.4.3. Genética

Genes supressores do tumor estão correlacionados com a carcinogênese do tumor de mama, como o BRCA1, BRCA2 (Rivera et al., 2009) e o gene Tp53 (De Nardi et al., 2007). Inúmeros proto-oncogenes e oncogenes são investigados para definir o potencial carcinogênico no tumor mamário canino, sendo o HER-2 (c-erbB-2), c-MYC, c-RAS e RR1 proto-oncogenes responsáveis pela regulação da proliferação celular (Dutra et al., 2004).

3.4.4. Enzima Cicloxigenase-2 (COX-2)

O desenvolvimento e progressão tumoral tem sido relacionada com a presença da COX-2, pois, sua super expressão auxilia em mecanismos associados à promoção tumoral, como aumento da angiogênese e proliferação celular, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase, têm sido propostos, baseados em estudos experimentais, para explicar as consequências da super expressão de COX-2 (De Nardi et al., 2007; Lavallo et al., 2009; De Nardi et al., 2011; Lavallo et al., 2012).

3.5. Fatores prognósticos e preditivos

3.5.1. Características da paciente

A idade avançada no momento do diagnóstico está relacionada por alguns autores a um menor tempo livre de doença e sobrevida (Alenza et al., 2000, Chang et al., 2005), enquanto outros autores não observaram tal relação (Philibert et al., 2003).

3.5.2. Características nutricionais

Em relação a composição corpórea e a composição da dieta, as conclusões são divergentes na literatura, enquanto o estudo conduzido por Philibert et al. (2003) a associação do tumor mamário com obesidade não demonstrou interferência no prognóstico, outro estudo, conduzido por Shofer et al. (1989), demonstrou que a obesidade está relacionada à menor sobrevida, e, após a intervenção cirúrgica da paciente, a ingestão de alimentos com alta taxa de proteína associada a baixa porcentagem de gordura foi associado com maior tempo de sobrevida.

3.5.3. Características macroscópicas

O crescimento rápido e invasivo do tumor, caracterizado pela fixação à pele e fáscia muscular são parâmetros clínicos associados ao pior prognóstico (Alenza et al., 2000), assim como a presença de ulceração e inflamação (Alenza et al., 2000; Oliveira Filho et al., 2010). O tamanho do tumor está diretamente associado a outros marcadores imuno-histoquímicos de prognósticos como a perda dos receptores hormonais (De Las Mulas et al., 2005; Ferreira et al., 2009) e ao alto índice de Ki-67 (Ferreira et al., 2009). A presença de metástase em linfonodos regionais ou a distância são fatores prognósticos negativos (Philibert et al., 2003; Chang et al., 2005; De Las Mulas et al., 2005; Araújo et al, 2015; Araújo et al, 2016).

3.5.4. Características histopatológicas

A análise histopatológica fornece informações fundamentais para a determinação do comportamento biológico do tumor, como a classificação do tipo e gradação histológica do tumor, determinação do número de figuras de mitose (índice mitótico), análise dos linfonodos satélites e das margens de segurança (Cassali et al., 2014).

Em relação ao tipo histológico, é reconhecido que os sarcomas possuem pior prognóstico quando comparado a carcinomas simples, e estes possuem pior prognóstico quando comparado aos carcinomas complexos (Sarli et al., 2002). Os subtipos histológicos denominados de carcinoma sólido, carcinoma anaplásico, carcinoma micropapilar e carcinosarcoma tornam necessária a indicação de quimioterapia adjuvante nas pacientes independente do estadiamento clínico (Cassali et al., 2014). Dentre estes, a apresentação clínica de carcinoma inflamatório possui evolução clínica agressiva de prognóstico desfavorável, com alto potencial metastático (Sá e Repetti, 2011; Cassali et al., 2014; Ribeiro et al., 2015). A gradação histológica é o fator prognóstico mais confiável para prever o comportamento biológico do tumor, devido à possibilidade de avaliação da invasão tumoral (Sarli et al., 2002; De Las Mulas et al., 2005).

Múltiplos métodos para determinar a proliferação celular podem ser empregados a fim de determinar o comportamento biológico e o potencial de malignidade do tumor, sendo relacionado a um prognóstico ruim. Entre os métodos estudados destaca-se o índice mitótico (Dutra et al., 2008), coloração histoquímica de regiões organizadoras nucleolares (AgNOR), marcador imuno-histoquímico Ki-67 (clone MIB-1), antígeno nuclear de células proliferativa (PCNA) (Sarli et al., 2002) e a mensuração da fração em fase S (SPF) (Alenza et al., 2000).

Os linfonodos são avaliados em busca de metástases. As células neoplásicas, quando encontradas no tecido linfoide, são classificadas em micrometástase, quando o tamanho da metástase é inferior a 0,2mm, e em macrometástase, quando o tamanho da metástase é entre 0,2 a 2mm. (Cassali et al., 2014). Metástase em linfonodos regionais é fator prognóstico negativo (De Las Mulas et al., 2005; Araújo et al, 2015; Araújo et al., 2016).

As margens cirúrgicas são avaliadas nas porções laterais (cranial, caudal, direita e esquerda) e profunda da peça cirúrgica, e podem ser identificadas com impregnação do tumor em tinta nanquim. Quando células neoplásicas são identificadas nesta área, podem ser classificadas como margens comprometidas ou margem exígua, e, quando as células neoplásicas estão ausentes como margens livres. Se comprometida, a disposição das células neoplásicas deve ser classificada como isoladas ou contínuas. Recomenda-se que as margens livres sejam mensuradas da distância da margem cirúrgica até o início da área comprometida, em milímetros (Cassali et al., 2014).

A positividade dos receptores hormonais não é fator prognóstico independente nas cadelas, sendo relacionado ao crescimento tumoral lento e menor gradação histológica destes (De Las Mulas et al., 2005; Ferreira et al., 2009).

A detecção imuno-histoquímica da proteína P53 é relacionada com a mutação do gene p53 e está associada à agressividade tumoral, representando prognóstico ruim (De Nardi et al., 2007).

A expressão da proteína HER-2 (receptor para o fator de crescimento epidérmico 2) varia de 17,6% (De Las Mulas et al., 2003) a 74% (Ahern et al., 1996) entre os estudos em tumores mamários em cadelas (Dutra et al., 2004). Em cadelas, a super expressão está relacionada com maior volume do tumor, alto grau histológico, crescimento invasivo e ausência dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), sendo um fator prognóstico ruim (De Las Mulas et al., 2003; Dutra et al., 2004).

A redução ou perda de expressão de E-caderina está relacionada com maior tamanho tumoral, alto grau histológico, invasão tumoral, metástase para linfonodo regional e alto índice mitótico, tornando-se assim, um marcador de pior prognóstico, relacionando-se com baixo tempo livre de doença e menor sobrevida (Gama et al., 2008).

A diminuição da expressão B-catenina está relacionada com indiferenciação celular, invasão e metástase para linfonodos regionais, influenciando negativamente no prognóstico (Cassali et al., 2014).

A expressão aumentada de COX-2 foi identificada em neoplasmas mamários (Dore et al., 2003; De Nardi et al., 2007; De Nardi et al., 2011) e definido que, quanto

mais indiferenciado é o tumor e mais agressiva é a doença, maior é a sua expressão (De Nardi et al., 2007), especialmente em relação aos carcinomas (Lascelles, 2007). O aumento da expressão desta enzima em pacientes com neoplasmas mamários está relacionado à menor sobrevida em cadelas (Lavalle et al., 2009). Além disso, De Nardi (2007) e Dias Pereira et al. (2009) constataram que a maioria das lesões metastáticas estudadas exibiam expressão aumentada da COX-2.

3.5.5. Características hormonais ou enzimáticas

Nas cadelas não submetidas à castração anterior, apesar das divergências entre os estudos, alguns demonstraram que a realização da OHE antes ou no momento da mastectomia proporciona melhor prognóstico (Misdorp, 1988; Sorenmo et al., 2000; Chang et al., 2005). Entretanto, outros estudos não observaram essa relação (Yamagami et al., 1996; Morris et al., 1998; Philibert et al., 2003).

O lactato desidrogenase (LDH) está presente no microambiente tumoral, relacionado à rápida proliferação celular e ao alto metabolismo, que levam a produção de LDH, tendo relação direta com o prognóstico (Campos et al., 2012).

A análise do antígeno câncer 15.3 (CA 15.3) é utilizada para monitorar resposta terapêutica e é capaz de distinguir doença não metastática de metastática, sendo um potencial marcador prognóstico (Campos et al., 2012).

3.5.6. Características do tratamento

Em relação à técnica cirúrgica realizada para o tratamento, estudos anteriores não encontraram relação com o prognóstico (Chang et al., 2005), não tendo relação com o tempo livre de doença e o tempo de sobrevida (Dias et al., 2016; Macewen et al., 1985). Entretanto, um estudo observou que cadelas submetidas à mastectomia regional tem 58% de chance de desenvolver novos tumores na cadeia ipsilateral, tornando necessário novo procedimento cirúrgico para retirada da porção remanescente da cadeia mamária (Stratmann et al., 2008).

3.5.7. Características genéticas

Utilizando a citometria de fluxo é possível analisar o DNA de tumores. A presença da aneuploidia é mais frequente em tumores malignos que em benignos e está relacionado ao pior prognóstico (Alenza et al., 2000).

3.6. Diagnóstico

O diagnóstico inicial é baseado no exame físico, na citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), sendo o exame histopatológico de eleição para o diagnóstico definitivo (Cassali et al., 2014).

O exame físico consiste na palpação das duas cadeias mamárias e dos linfonodos regionais em busca de nódulos e de alterações no tamanho, forma e consistência, respectivamente. Além disso, reúnem-se informações a respeito do tempo de aparecimento e evolução da lesão, tratamentos prévios e histórico reprodutivo (Silva, 2006; Cassali et al., 2014).

A CAAF dos nódulos é utilizada para excluir diagnósticos diferenciais como mastite e tumores cutâneos, tais como lipomas, mastocitomas, carcinomas de células escamosas, entre outras afecções (Cassali et al., 2014).

Para o diagnóstico final, recomenda-se a análise histopatológica, que se baseia na morfologia, pleomorfismo, grau de diferenciação celular, índice mitótico, presença ou ausência de necrose e avaliação de margem cirúrgica. Também é possível avaliar a infiltração tumoral na derme, tecidos moles adjacentes e vasos sanguíneos (Cassali et al., 2014).

Há várias classificações histológicas descritas em medicina veterinária. No Brasil, atualmente utiliza-se a classificação de Cassali et al. (2014), definida no Consenso para o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores Mamários Canino – 2013 (Apêndice A).

A graduação histológica é determinada considerando-se a formação tubular do tumor, o pleomorfismo nuclear e a contagem de mitoses (Apêndice B) (Cassali et al., 2014). Estes parâmetros objetivam prever o comportamento biológico do tumor, através da possibilidade de avaliação da invasão tumoral (De Las Mulas et al., 2002).

A CAAF dos linfonodos pode apresentar resultado falso negativo, principalmente na presença de micrometástases ou aglomerados de células tumorais (Weaver, 2010). Sendo assim, a avaliação mais fidedigna é a análise histopatológica do(s) linfonodo(s) sentinela(s), e eventualmente, colorações imuno-histoquímica são necessárias para análise (Cassali et al., 2014). O linfonodo sentinela é o primeiro linfonodo da cadeia linfática que drena a região afetada pelo tumor primário, sendo esperado que seja o primeiro linfonodo a ser afetado por metástase pela via linfática. (Weaver, 2010 Cassali et al., 2014;). A identificação pode ser facilitada através de marcadores como o azul de metileno (Souza et al., 2013), tecnécio Tc99, azul patente (Pinheiro et al., 2003), hemossiderina autógena (Pinheiro et al., 2009), verde de indocianina (Miyashiro et al., 2010) e iopamidol (Suga et al., 2007).

3.7. Estadiamento

O estadiamento dos neoplasmas mamários em cadelas avalia a extensão do envolvimento tumoral, graduando sua fase de evolução tumoral, bem como as possibilidades de progressão do tumor, no seu sítio de origem e em outros órgãos (metástases). O estadiamento clínico é realizado de acordo com o sistema TNM para os tumores mamários caninos. Com base nesse sistema o tamanho da lesão primária (T), a extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M) devem ser avaliados (Owen, 1980) (Apêndice C).

3.8. Tratamento

3.8.1. Cirúrgico

Até o momento, a terapia cirúrgica, realizada com ampla margem de segurança, é considerada o tratamento que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (Silva, 2006; Lana et al., 2007; Cassali et al., 2014), porém existem controvérsias quanto aos benefícios da realização de técnicas cirúrgicas radicais em detrimento de técnicas conservadoras (Stratmann et al., 2008). Diferentes técnicas cirúrgicas podem ser empregadas, como nodulectomia ou lumpectomia (ou biopsia

excisional), mamectomia ou mastectomia simples, mastectomia em bloco (ou regional) e mastectomia unilateral ou bilateral (em um ou dois tempos cirúrgicos) (Silva, 2006; Cassali et al., 2014).

Fatores como idade, presença ou não de doenças que comprometem o procedimento cirúrgico, estadiamento clínico, tamanho e localização do tumor podem auxiliar na escolha da técnica cirúrgica (Silva, 2006; Cassali et al., 2014). A lumpectomia remove apenas o tecido nodular presente na glândula mamária e é considerada para remover nódulo único, não aderido, de tamanho menor que 0,5 centímetros de diâmetro (Silva, 2006; Cassali et al., 2014). A mamectomia corresponde à remoção de uma glândula mamária e é sugerida para remoção de nódulos de até três centímetros de diâmetro que afeta apenas uma glândula mamária (Cassali et al., 2014). A mastectomia regional é indicada para nódulos maiores que três centímetros de diâmetro e sua excisão considera as comunicações linfáticas mais comuns na cadela (Cassali et al., 2014). A mastectomia radical unilateral consiste na remoção de uma cadeia mamária completa e é recomendada para remoção de múltiplos nódulos maiores que três centímetros de diâmetro ou nódulo presente na mama abdominal cranial (Cassali et al., 2014). A mastectomia radical bilateral abrange a remoção das duas cadeias mamárias em um único procedimento cirúrgico e é utilizada para remoção de múltiplos nódulos, maiores que três centímetros de diâmetro e presentes nas duas cadeias mamárias (Cassali et al., 2014).

Apesar de inexistir consenso em relação à técnica cirúrgica ideal, alguns autores indicam a mastectomia radical unilateral (ou bilateral em 2 procedimentos, quando necessário) como tratamento de neoplasmas mamárias com caráter preventivo, pois este tipo de conduta minimiza os riscos futuros do desenvolvimento do câncer em virtude da redução do tecido mamário (Misdorp; HART, 1979; Stratmann et al., 2008; Kasper et al., 2015), enquanto outros autores indicam a mastectomia regional (Brodey et al., 1983; Moulton, 1990; Sautet et al., 1992; Novosad, 2003). Enquanto não há argumentos claros e precisos sobre a conduta única, a abordagem personalizada tem sido mencionada com maior frequência nos últimos anos, recomendando a técnica cirúrgica de acordo com os fatores prognósticos descritos na literatura (número, tamanho e localização dos tumores) (Sorenmo et al., 2009; Horta et al., 2014; Dias et al., 2016).

O carcinoma mamário inflamatório é um caso excepcional, para o qual não é indicado o procedimento cirúrgico, devido ao seu alto potencial metastático (Cassali et al., 2014). Outras modalidades terapêuticas são aplicadas de forma paliativa em tumores não operáveis (como o carcinoma inflamatório e tumores não ressecáveis) como a radioterapia (Rassnick, 2005).

3.8.2. Quimioterapia antineoplásica

Pacientes caninas com neoplasma mamário em estágios avançados recebem a indicação de tratamento adjuvante após ao procedimento cirúrgico, sendo a quimioterapia antineoplásica adjuvante utilizada com o intuito de prevenir o desenvolvimento de metástases ou controlá-la, quando existente previamente, entretanto, sua efetividade no tratamento dos neoplasmas mamários em cadelas é relatada por alguns autores (Karayannopoulou et al. 2001; Marconato et al., 2009; Lavallo et al., 2012; Arenas et al., 2016), enquanto outros não observam seus benefícios (Simon et al., 2006; Marconato et al., 2008; Tran et al., 2016).

A atividade proliferativa está associada à susceptibilidade das células ao tratamento quimioterápico, sendo mais susceptíveis à ação quimioterápica os tumores com alto índice proliferativo, pois este tratamento atua em células em divisão celular (De Nardi et al., 2007). Sendo assim, os efeitos colaterais mais observados dos agentes antineoplásicos são mielosupressão, desordens gastrointestinais e alopecia (Cassali et al., 2014). São sugeridos protocolos como: 5-fluorouracil e ciclofosfamida (Karayannopoulou et al., 2001); doxorubicina e ciclofosfamida; cisplatina (Cassali et al., 2014); gencitabina e carboplatina (Dominguez et al., 2009); doxorubicina e carboplatina (Cassali et al., 2014), carboplatina (Lavallo et al., 2012); paclitaxel (Poirier et al., 2004); docetaxel ou doxorubicina (Simon et al., 2006). Em câncer de mama metastático recomendam-se os seguintes fármacos: capecitabina, doxorubicina, gencitabina, paclitaxel, docetaxel e vinorelbina, sendo utilizados preferencialmente em protocolos com múltiplos agentes associados (Hovens et al., 2009).

Na última década, um método alternativo de administração de quimioterápicos foi inserido na rotina clínica, a quimioterapia metronômica. Este método utiliza baixas doses de quimioterápicos administrados continuamente com o intuito de alterar o

microambiente tumoral. O protocolo mais utilizado em medicina veterinária é a ciclofosfamida. Também pode-se utilizar o agente quimioterápico de forma metronômica em associação com outros agente anti tumorais como a prednisona e AINE (Lien et al., 2013).

3.8.3. Radioterapia

A radioterapia em cadelas com neoplasmas mamários é limitada e pouco efetiva no seu tratamento, sendo considerada apenas em situações com tumores muito extensos para o procedimento cirúrgico (Lana et al., 2007), principalmente em relação à margem profunda, visto que as margens laterais podem ser removidas ao associar técnicas de cirurgia reconstrutora. A efetividade da radiação para tumores com margens incompletas não foi definida em cães (Lana et al., 2007). Além disso, seu acesso é restrito no Brasil, devido ao alto custo e baixa disponibilidade.

3.8.4. Hormonioterapia

O tratamento alvo para os hormônios esteroides tem maior efeito nos estágios iniciais da carcinogênese e perde sua eficácia em estágios mais avançados da doença, devido a sua maior expressão em processos benignos que em malignos (Alenza et al., 2000). No caso de tumores mamários com receptores de estrógeno positivos (cerca de 33%) é possível a realização de terapia alvo, com a utilização de fármacos como o Tamoxifeno, porém, apesar da resposta clínica deste tratamento, cadelas tratadas desenvolvem com frequência efeitos colaterais, como aumento vulvar, secreção vaginal, incontinência urinária, infecção do trato urinário, piometra e sintomatologia da fase estral, não sendo recomendado seu uso. Similarmente, tumores mamários com receptores de progesterona positivos (cerca de 50%), pode-se realizar a terapia com antagonistas de receptores de progesterona (como aglepristone) para controle pós-operatório da doença (De Las Mulas et al., 2005).

3.8.5. Terapia gênica

Terapia gênica tem sido estudada experimentalmente com tumores caninos utilizando adenovírus como vetor expressando P53 (AxCA-cp53), com intuito de induzir a parada do ciclo celular (Kanaya et al., 2011).

3.8.6. Imunoterapia

A imunoterapia é um campo promissor e em expansão na medicina veterinária, visando o tratamento do câncer. Estudos em cadelas com neoplasmas mamários utilizam imunoterapia específica, por meio do desenvolvimento de vacinas utilizando células dendríticas, para servir como apresentadoras de antígenos, resultando na produção de anticorpos antitumorais. Entretanto, a medicina veterinária possui estudos preliminares para o desenvolvimento de vacinas no combate ao câncer, utilizando estratégias para otimizar a resposta imune antitumoral induzida (Dow e Guth, 2019).

3.8.7. Tratamento com o uso de inibidores de COX-2

Atualmente, relatos na literatura humana (Ashok et al., 2011) e veterinária (Lloret et al., 2007) têm documentado a ação dos AINEs contra o câncer de mama, por meio da capacidade de inibir seletivamente a cicloxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente, diversos mecanismos associados com o desenvolvimento deste neoplasma. Na oncologia, é preferido o uso de inibidores seletivos de COX-2, devido seu baixo potencial de efeitos colaterais, e sua utilização pode ser associada à diversas modalidades terapêuticas, como na quimioprevenção, quimioterapia antineoplásica, radioterapia ou como terapia única (De Nardi et al., 2011; Lavallo et al., 2012).

3.9. Prognóstico

A taxa de sucesso do tratamento de um paciente portador de neoplasma mamário é influenciada por diversos fatores, de acordo com a agressividade tumoral e com o avanço da doença no organismo (Sorenmo, 2003). Esta avaliação com precisão, realizada baseada nos fatores prognósticos, é fundamental para eleger a terapia ideal e individual para cada paciente e evitar a indicação e realização de terapias muito brandas e insuficientes em pacientes com neoplasmas agressivos e/ou em estágios avançados ou terapias agressivas e com alta toxicidade em pacientes com neoplasmas pouco agressivos e/ou em estágios iniciais.

3.10. Recomendações

A medicina veterinária é atualizada constantemente, sendo assim, as recomendações são adaptadas de acordo com os estudos mais recentes. Sendo assim, o último Consenso para o Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento de Tumores Mamários Canino, realizado em 2019, recomenda que a prevenção deve ser realizada pela realização da OHE. Entretanto, a idade indicada deve ser estipulada de forma individualizada, levando em consideração fatores sociais e hormonais. De forma generalizada, recomenda-se a castração da cadela de pequeno e médio porte entre o primeiro e o segundo cio e da cadela de grande e gigante porte entre o segundo e o terceiro cio.

3.11. Referências

Ahern TE, Bird RC, Bird AE, Wolfe LG (1996) Expression of the oncogene c-erbB-2 in canine mammary cancers and tumor-derived cell lines. **American Journal of Veterinary Research** 57:693–696.

Alenza DP, Rutteman GR, Peña L, Beynen AC, Cuesta P (1998) Relation between habitual diet and canine mammary tumors in a case-control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 12:132-139.

Alenza P, Peña L, Castillo ND, Nieto AI (2000) Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice** 41:287-291.

Allen SW, Mahaffey EA (1989) Canine mammary neoplasia: prognostic indicators and response to surgical therapy. **Journal of the American Animal Hospital Association** 25:540-546.

Allen SW, Prasse KW, Mahaffey EA. (1986) Cytologic differentiation of benign from malignant canine mammary tumors. **Veterinary Pathology** 23(6):649-655.

Araújo MR, Campos LC, Damasceno KA, Gamba CO, Ferreira E, Cassali GD (2016) HER-2, EGFR, Cox-2 and Ki67 expression in lymph node metastasis of canine mammary carcinomas: Association with clinical-pathological parameters and overall survival. **Research in Veterinary Science** 106:121-30.

Araújo MR, Campos LC, Ferreira E, Cassali GD (2015) Quantitation of the Regional Lymph Node Metastatic Burden and Prognosis in Malignant Mammary Tumors of Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 5:1360-1367.

Arenas C, Peña L, Granados-Soler JL, Pérez-Alenza MD (2016) Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. **Veterinary Record**, p. vetrec-2015-103398.

Ashok V, Dash C, Rohan TE, Sprafka JM, Terry PD (2011) Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. **Breast** 20(1):66-70.

Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, Mcdonough SP (2003) An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. **Veterinary Pathology** 40(5):496-500.

Borzacchiello G, Russo V, Russo M (2007) Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in canine ovarian carcinomas. **Journal of Veterinary Medicine - Series A** 54(5):247-249.

Brito ESA, Santos AS, Santin API, Moura LR, Pôrto RNG, Moura VMDB (2013) Avaliação retrospectiva de tumores mamários caninos encaminhados ao setor de patologia animal/EVZ-UFG no período de janeiro de 2007 até abril de 2013. **Archives of Veterinary Science** 18(2):200.

Brodey, RS, Goldschmidt MH, Roszel JR (1983) Canine mammary gland neoplasms. **Journal of American Animal Hospital Association** 19:61-90.

Calderón C (2005) **Avaliação da ciclooxigenase-2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imuno-histoquímica**. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.

Campos LC, Lavalley GE et al. (2012) CA15.3, CEA, and LDH in dogs with malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 26:1383-1388.

Cassali GD, Lavalle GE et al. (2014) Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology** 7(2):38–69.

Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML (2005) Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 227(10):1625-1629.

Clemente M, Sánchez-Archidona AR et al. (2013) Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. **The Veterinary Journal** 197(2):427-432.

Daleck CR, Franceschini PH, Alessi AC, Santana ÁE, Martins MIM (1998) Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. **Ciência Rural** 28(1):95-100.

De Las Mulas JM, Millán Y, Dios R (2005) A prospective analysis of immunohistochemically determined estrogen receptor and progesterone receptor expression and host and tumor factors as predictors of disease-free period in mammary tumors of the dog. **Veterinary Pathology** 42:200–212.

De Las Mulas JM, Ordás J, Millán Y, Fernández-Soria V, Cajal SR (2003) Oncogene HER-2 in canine mammary gland carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment** 80(3):363-367.

De Nardi AB, Rodaski S, Rocha NS, Fernandes SC (2009) Neoplasias mamárias. In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodaski S (1. ed.) **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Roca, p. 372-383.

De Nardi AB, Rodaski S et al. (2002) Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães. **Archives of Veterinary Science** 7:15-26.

De Nardi AB, Daleck CR, Amorin RL, Rodaski S, Calderon C, Neto RT, Malaver AU (2007) Immunoexpression of cyclooxygenase-2 in mammary neoplasia in dogs. **Selecciones Veterinarias** 15:9-13.

De Nardi AB, Raposo TMM, Huppés RR, Daleck CR, Amorim RL (2011) COX-2 inhibitors for cancer treatment in dogs. **Pakistan Veterinary Journal** 31(4):275-279.

Dias Pereira P, Lopes CC, Matos AJ, Santos M, Gärtner F, Medeiros R, Lopes C (2009) COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **Journal of the Comparative Pathology** 140(4):247-253.

Dias MLM, Andrade JML, Castro MBD, Galera PD (2016) Survival analysis of female dogs with mammary tumors after mastectomy: epidemiological, clinical and morphological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 36(3):181-186.

Dominguez PA, Dervisis NG, Cadile CD, Sarbu L, Kitchell BE (2009) Combined gemcitabine and carboplatin therapy for carcinomas in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 23:130–137.

Dore M, Lanthier I, Sirois J (2003) Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. **Veterinary Pathology** 40(2):207–212.

Dow S, Guth AM (2019) Cancer immunotherapy. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM (6th ed) **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Elsevier, p. 231-250.

Dutra AP, Azevedo Junior GM, Schmitt FC, Cassali GD (2008) Assessment of cell proliferation and prognostic factors in canine mammary gland tumors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 60:1403-12.

Dutra AP, Granja NVM, Schmitt FC, Cassali GD (2004) C-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 37:11.

Evans HE, Christensen GC (1993) **Miller's Anatomy of the Dog** (3. Ed) WB Saunders, Philadelphia. 1113p.

Ferreira E, Bertagnolli AC, Cavalcanti MF, Schmitt FC, Cassali GD (2009) The relationship between tumor size and expression of prognostic markers in benign and malignant canine mammary tumors. **Veterinary and Comparative Oncology** 193:1-6.

Fonseca CS, Daleck CR (2000) Neoplasias mamárias em cadelas: influência hormonal e efeitos da ovario-histerectomia como terapia adjuvante. **Ciência Rural** 30(4):731-735.

Gama AA, Paredes JBC, Gärtner F, Alves A, Schmitt F (2008) Expression of E-cadherin, P-cadherin and b-catenin in canine malignant mammary tumours in relation to clinicopathological parameters, proliferation and survival. **The Veterinary Journal** 177:45–53.

Giardiello FM, Offerhaus GJA, Dubois RN (1995) The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. **European Journal of Cancer** 31(7):1071-1076.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC (1994) Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. **Annals of Internal Medicine** 121(4):241-246.

Grösch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G (2006) Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. **Journal of the National Cancer Institute** 98(11):736-747.

Guénius SD, Sprea G, Deconto I, Okar R (2002) Exame gastroscópico após administração oral de anti-inflamatórios não esteroidais em cães. **Archives of Veterinary Science** 7(2):53-58.

Heller DA, Clifford CA, Goldschmidt MH, Holt DE, Shofer FS, Smith A, Sorenmo KU (2005) Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Veterinary Pathology** 42(6):776-780.

Horta RS, Lavallo GE, de Castro Cunha RM, de Moura LL, de Araújo RB, Cassali GD (2014) Influence of surgical technique on overall survival, disease free interval and new lesion development interval in dogs with mammary tumors. **Advances in Breast Cancer Research** 3(2):38.

Hovens C, Corcoran N, Costello A (2009) Biological applications of steroid binding domains. U.S. **Patent Application**: n. 13/057,927, 7 ago.

Impellizeri JA, Esplin DG (2008) Expression of cyclooxygenase-2 in canine nasal carcinomas. **Veterinary Journal** 176(3):408-410.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer: estimativa 2020**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso em 25 de Outubro de 2020.

Joubert KE (2009) The effects of firocoxib (Previcox) in geriatric dogs over a period of 90 days. **Journal of the South African Veterinary Association** 80(3):179-84.

Kanaya N, Yazawa M et al. (2011) Anti-Tumor effect of adenovirus-mediated P53 gene therapy on the growth of canine osteosarcoma transplanted into nude mice. **Journal of Veterinary Medical Science** 73(7):877-883.

Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis TC, Dessiris A (2001) Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clínica Medicine** 48:85-96.

Kasper PN (2015) **Aspectos evolutivos de neoplasmas mamários em cadelas nos diferentes tratamentos cirúrgicos: estudo retrospectivo**. 43 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

Klopfleisch R, Gruber AD (2009) Differential expression of cell cycle regulators p21, p27 and p53 in metastasizing canine mammary adenocarcinomas versus normal mammary glands. **Research in Veterinary Science** 87:91-96.

Kristiansen VM, Nodtvedt A et al. (2013) Effect of Ovariohysterectomy at the Time of Tumor Removal in Dogs with Benign Mammary Tumors and Hyperplastic Lesions: A Randomized Controlled Clinical Trial. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 27:935–942.

L'eplattenier HF, Lai CL, Van Den Ham R, Mol J, Van Sluijs F, Tesk E (2007) Regulation of COX-2 expression in canine prostate carcinoma: increased COX-2 expression is not related to inflammation. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 21(4):776-782.

Lana SE, Rutteman GR, Withrow SJ (2007) Tumors of the Mammary Gland. In: Withrow SJ, Vail DM (4^a ed.) **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Saint Louis: Saunders Elsevier. p. 619-628.

Lascelles BDX (2007) Supportive care for the cancer patient. In: Withrow SJ, Vail DM (4^a ed.) **Withrow & MacEwen's Small Animal Clinical Oncology**. Saint Louis: Saunders Elsevier. p. 291-306.

Lavalle GE, Campos CB, Bertagnolli AC, Cassali GD (2012) Canine malignant mammary gland neoplasias with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo** 26:375-9.

Lavalle GE, Bertagnolli AC, Tavares WLF, Cassali GD (2009) Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary Pathology** 46(6):1275-1280.

Lien K, Georgsdottir S, Sivanathan L, Emmenegger U (2013) Low dose metronomic chemotherapy: A systematic literature analysis. **European Journal of Cancer** 49(16):3387-3395.

Lloret Rocha A, Aceña MC et al (2007) Resultados preliminares con el uso de firocoxibe en 60 neoplasias caninas. **Southern European Veterinary Conference (SEVC)**. 42º Congreso Nacional AVEPA. Barcelona.

Lorke M, Willen M et al. (2020) Effect of antioxidants, mitochondrial cofactors and omega-3 fatty acids on telomere length and kinematic joint mobility in young and old shepherd dogs—A randomized, blinded and placebo-controlled study. **Research in Veterinary Science** 129:137-153.

Luna SP, Basilio AC, Steagall PV, Machado LP, Moutinho FQ, Takahira RK, Brandao CV (2007) Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. **American Journal of Veterinary Research** 68(3):258-264.

MacEwen EG, Harvey HJ, Patnaik AK, Mooney S, Hayes A, Kurzman I, Hardy Jr WD (1985) Evaluations of effects of levamisole and surgery on canine mammary cancer. **Journal of Biological Response Modifiers** 4:418–426.

Marconato L, Lorenzo RM, Abramo F, Ratto A, Zini E (2008) Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology** 6(2):90-101.

Marconato L, Romanelli G et al. (2009) Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association** 235(8):967-972.

Mcentee MF, Cates JM, Neilsen N (2002) Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. **Veterinary Pathology** 39(4):428-436.

Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A (2006) COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic for molecular markers. **Breast cancer research and treatment** 98(1):115-120.

Misdorp W (1988) Canine mammary tumours: protective effect of late ovariectomy and stimulating effect of progestins. **Veterinary Quarterly** 10:26–33.

Misdorp W, Hart AAM (1979) Canine mammary cancer II. Therapy and causes of death. **Journal of Small Animal Practice** 20:395–404.

Miyashiro I, Kishi K et al. (2011) Laparoscopic detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging. **Surgical Endoscopy** 25(5):1672-1676.

Mohammed SI, Khan KNM et al. (2004) Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids** 70(5):479-483.

Morris JS, Dobson JM, Bostock DE, O'Farrell E (1998) Effect of ovariohysterectomy in bitches with mammary neoplasms. **Veterinary Record** 13:656–658.

Moulton JE (1990) Tumors of the mammary gland, in: Moulton JE (3. ed.) **Tumors of Domestic Animals**, Berkeley, CA, University of California Press, p. 518–552.

Novosad CA (2003) Principles of treatment for mammary gland tumors. **Clínical Techniques in Small Animal Practice** 18(2):107-109.

Oliveira Filho JC, Kommers GD, Masuda EK, Marques BM, Figuera RA, Irigoyen LF, Barros CS (2010) Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 30(2):177-185.

Oliveira LO, de Oliveira RT, Loretto AP, Rodrigues R, Driemeier D (2003) Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae** 31(2):105-110, 2003.

Owen LN (1980) TNM classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32.

Panickar KS, Jewell DE (2015) The beneficial role of anti-inflammatory dietary ingredients in attenuating markers of chronic low-grade inflammation in aging. **Hormone molecular biology and clinical investigation** 23(2):59-70.

Patsikas MN, Dessiris (2006) The lymph drainage of the neoplastic mammary glands in the bitch: a lymphographic study. **Anatomia Histologia Embryologia** 35:228-34.

Philibert JC, Snyder PW, Glickman N, Glickman LT, Knapp DW, Waters DJ (2003) Influence of host factors on survival in dogs with malignant mammary gland tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 17:102–106.

Piekarz CH, Biondo AW, Amorim RL, Rodaski S, Barros Filho IR, De Nardi AB. (2008) Expressão das caderinas nos tumores mamários em cadelas. **Archives of Veterinary Science** 13(1):13-21.

Pinheiro LGP, Moraes MO (2003) Estudo experimental de linfonodo sentinela na mama da cadela com azul patente e tecnécio Tc99. **Acta Cirúrgica Brasileira** 18:545-52.

Pinheiro LGP, Oliveira Filho RS et al. (2009) Hemosiderin: a new marker for sentinel lymph node identification. **Acta Cirúrgica Brasileira** 24:432-6.

Pires I, Garcia A, Prada J, Queiroga FL (2010) COX-1 and COX-2 expression in canine cutaneous, oral and ocular melanocytic tumours. **Journal of Comparative Pathology** 143(2):142-149.

Poirier VJ, Hershey AE et al. (2004) Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 18:219–222.

Priebe APS, Riet-Correa G, Paredes LJA, Costa MSF, Silva CDC, Almeida MB (2011) Ocorrência de neoplasias em cães e gatos da mesorregião metropolitana de Belém, PA entre 2005 e 2010. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 63(6):1583-1586.

Queiroga FL, Alves A, Pires I, Lopes C (2007) Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. **Journal of comparative pathology** 136(2-3)177-185.

Queiroga FL, Pires I, Lobo L, Lopes CS (2010) The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. **Research in Veterinary Science** 88(3):441–445.

Rassnick KM (2005) How I treat canine mammary gland tumors. In: North American Veterinary Conference. **Proceedings**, Orlando, p.666-7.

Reis FR, Barreira APB, Castro V, Castro JLC, Suzano SMC, Rocha AA (2010) Índícios sobre a correlação entre diferentes métodos diagnósticos em casos de tumor de mama em cadelas. **Revista Eletrônica Novo enfoque** 9(9):14-31.

Ribas CR, Dornbusch PT, de Faria MR, de Figueiredo Wouk AFP, Cirio SM (2012) Alterações clínicas relevantes em cadelas com Neoplasias Mamárias estadiadas. **Archives of Veterinary Science** 17(1):60-68.

Ribeiro LGR, Estrela-Lima A et al. (2015) Clínic, pathological and prognostic data from 37 female dogs with inflammatory mammary carcinoma. **Online Journal of Veterinary Research** 19:1-14.

Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H (2009) Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. **Cancer Research** 69(22):8770-8774.

Rodaski S, Piekarcz CH (2009) Epidemiologia e Etiologia do Câncer. In: Daleck CR, De Nardi AB, Rodaski S (1 ed) **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo: Editora Roca LTDA. p. 1-22.

Rossmeis JH Jr, Robertson JL, Zimmernam KL, Higgins MA, Geiger DA (2009) Cyclooxygenase-2 (COX-2) expression in canine intracranial meningiomas. **Veterinary and comparative oncology** 7(3):173-180.

Sá SS, Repetti CSF (2011) Carcinoma inflamatório mamário canino – Revisão de Literatura. **Acta Veterinária Brasileira** 5(1):8-14.

Sarli G, Preziosi R, Benazzi C, Castellani G, Marcato PS (2002) Prognostic value of histologic stage and proliferative activity in canine malignant mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 14:25-34.

Sautet JY, Ruberte J, Lopez C, Gine JM, Ordonez G, Cingia A (1992) Lymphatic system of the mammary gland in the dog; an approach to the surgical treatment of malignant mammary tumors. **Canine Practice** 17:30–33.

Schneider R, Dorn CR, Taylor DON (1969) Factors influencing canine mammary tumor development and postsurgical survival. **Journal of National Cancer Institute** 43:1249-1.

Shofer FS, Sonnenschein EG, Goldschmidt MH, Laster LL, Glickman LT (1989) Histopathologic and dietary prognostic factors for canine mammary carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment** 13:49–60.

Silva JRS (2006) **Mastectomia em cadelas – Variações da técnica segundo a drenagem linfática da cadeia mamária – revisão de literatura**. 45 f. Monografia (Pós-graduação "Lato sensu" em Clínica Médica e Cirúrgica em Pequenos Animais) – Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro.

Simon D, Schoenrock D, Baumgärtner W, Nolte I (2006) Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 20:1184–1190.

Sirivaidyapong S (2003) Dogs with mammary gland tumors and the feeding dietary types. In: World Small Animal Veterinary Association World Congress. **Proceedings**, Bangkok.

Sorenmo K (2003) Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice** 33:573-596.

Sorenmo KU, Kristiansen VM et al. (2009) Canine mammary gland tumours; a histological continuum from benign to malignant; clinical and histopathological evidence. **Veterinary and Comparative Oncology** 7(3):162–172.

Sorenmo KU, Shofer FS, Goldschmidt MH (2000) Effect of spaying and timing of spaying on survival of dogs with mammary carcinoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 14:266-270.

Souza CHM, Toledo-Piza E, Amorim R, De Nardi AB, Tobias KM (2009) Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Canadian Veterinarian Journal** 50(5):506-510.

Souza FW, Brun MV et al. (2013) Linfadenectomia laparoscópica em cadela com neoplasia mamária. **Ciência Rural** 43:750-3.

Stratmann N, Failing K, Richter A, Wehrend A (2008) Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. **Veterinary Surgery** 37(1):82-86.

Suga K, Karino Y et al. (2007) Cutaneous drainage lymphatic map with interstitial multidetector-row computed tomographic lymphography using iopamidol: preliminary results. **Lymphology** 40:63-73.

Toríbio JMML, Lima AE et al. (2012) Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres** 59(4):427-433.

Tran CM, Moore AS, Frimberger AE (2016) Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary and comparative oncology** 14(3):252-262.

Wang LS, Huang YW et al. (2006) Conjugated linoleic acid (CLA) modulates prostaglandin E2 (PGE2) signaling in canine mammary cells. **Anticancer Research** 26(2A):889-898.

Weaver DL (2010) Pathology evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer: protocol recommendations and rationale. **Modern Pathology** 23:S26–S32.

Yamagami T, Kobayashi T, Takahashi K, Sugiyama M (1996) Influence of ovariectomy at the time of mastectomy on the prognosis for canine malignant mammary tumours. **Journal of Small Animal Practice** 37:462–464.

Zuccari DAPC (2001) **Estudo imunocitoquímico de marcadores diagnósticos e prognósticos em neoplasias mamárias caninas**. 92 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAPITULO 2 - Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno

Abstract.- Firmo B.F., Estrada C.V.R., Marozeni M., Ferreira M.G.P.A., Senhorello I.L.S., Cassali G.D., De Nardi A.B. 2020. [**Survival of bitches with mammary carcinoma undergoing mastectomy with or without carprofen treatment.**] Sobrevida de cadelas com carcinoma mamário submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

In bitches, the most frequent neoplastic process is the mammary tumor. Mechanisms associated with tumor promotion such as increased angiogenesis, inhibition of apoptosis, modulation of the immune response, increased invasiveness, and metastasis have been proposed to explain consequences of the overexpression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in neoplastic cells. Due to the relationship between COX-2 and the development of cancer, the objective of this study was to evaluate survival of bitches with mammary carcinomas submitted to mastectomy with or without carprofen administration, as well the tolerance of the treatment. For this study, 20 female dogs with stage III and IV mammary carcinoma were. In 6 months of follow-up, two deaths were observed in the control group while in the treated group, two deaths were observed. Regarding disease-free time, nodules on organs were observed in the control group in five patients while in the group treated were observed in three patients. The general expression of COX-2 was 70%. By the multiple correspondence analysis, there was an association between patients whose presented grade I carcinoma with absence of COX-2 expression ($p = 1$). Patients whose performed survival between 6 and 12 months were associated with those which presentation of a single nodule and those with tumors of intermediate mitotic index ($p = 1$). By the chi-square test, it was observed that the mitotic index parameter analyzed in the histopathological exam may be able to segregate survival groups ($p = 0.06$). No patient had serious side effects, which indicated the interruption of treatment. COX-2 expression identified in most patients supports the indication of anti-inflammatory therapy in canine mammary carcinoma. The inclusion of biomarkers in clinical decision-making is increasingly important in veterinary oncology to practice individualized therapy, and thus, predict patients whose will respond to treatment or will not. In addition, the use of carprofen was safe for use for prolonged periods (90 days) in dogs.

INDEX TERMS: Cyclooxygenase, dogs, mammary gland, mastectomy, tumor.

Resumo.- Em cadelas, o processo neoplásico mais frequente é o tumor mamário. Mecanismos associados à promoção tumoral, como aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e ocorrência de metástases, têm sido propostos para explicar as consequências da super expressão de cicloxigenase-2 (COX-2) nas células neoplásicas. Em virtude da relação da COX-2 com o desenvolvimento do câncer, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevida de cadelas com carcinoma mamário, submetidas à mastectomia acompanhada ou não da administração de carprofeno, bem como sua tolerância, e, para isso, foram selecionadas 20 cadelas com carcinoma mamário, em estágio III e IV. Em 6 meses de acompanhamento, no grupo controle foram observados dois óbitos, enquanto no grupo tratado foram observados dois óbitos. Em relação ao tempo livre de doença, observou-se surgimento de

nódulos em órgãos, no grupo controle em cinco pacientes, enquanto no grupo tratado em três pacientes. A expressão geral de COX-2 foi de 70%. Pela análise de correspondência múltipla, houve associação entre pacientes que apresentaram carcinoma grau I e ausência de expressão de COX-2 ($p=1$). Pacientes que apresentaram sobrevida entre 6 e 12 meses foram associadas àquelas com a apresentação de nódulo único e com tumores de índice mitótico intermediário ($p=1$). Pelo teste qui-quadrado, observou-se que o parâmetro índice mitótico analisado no exame histopatológico pode ser capaz de segregar grupos de sobrevida ($p=0,06$). nenhuma paciente teve efeitos colaterais graves, os quais indicassem a interrupção do tratamento. A expressão de COX-2 identificada na maioria das pacientes suporta a indicação da terapia anti-inflamatória em neoplasmas mamários caninos. A incorporação de biomarcadores na tomada de decisão clínica é cada vez mais importante na oncologia veterinária, para praticar a terapia individualizada, e assim, predizer os pacientes que irão ou não responder ao tratamento. Além disso, o uso do carprofeno foi seguro para a utilização por períodos prolongados (90 dias) em cães.

INTRODUÇÃO

O neoplasma mais comum em cadelas não castradas é o mamário, sendo em torno de 52% dos neoplasmas diagnosticados (DE NARDI et al., 2009; OLIVEIRA FILHO et al., 2010). A incidência de malignidade em câncer de mama diagnosticados em cadelas brasileiras corresponde a até 90,9% dos casos (BRITO et al., 2013; DE NARDI et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA FILHO et al., 2010; PRIEBE et al., 2011; TORÍBIO et al., 2012). As metástases ocorrem preferencialmente por via linfática (DE NARDI et al., 2009), e em torno de 50% dos casos (OLIVEIRA FILHO et al., 2010). O câncer de mama possui heterogeneidade, sendo que a paciente pode apresentar vários nódulos ou os nódulos podem apresentar tipos histológicos distintos (ALENZA et al., 2000, CASSALI et al., 2014).

A cicloxigenase (COX) é relacionada à formação de mediadores inflamatórios. O desenvolvimento e a progressão tumoral tem sido relacionados com a presença da cicloxigenase-2 (COX-2), associado à mecanismos como a angiogênese e proliferação celular, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, capacidade de invasão e metástase. Tumores da glândula mamária canina expressam COX-2, especialmente os de origem epitelial, sendo relacionado com prognóstico ruim e com agressividade (HELLER et al., 2005; DE NARDI et al., 2007; DIAS PEREIRA et al., 2009; LAVALLE et al., 2009; SOUZA et al., 2009; DE NARDI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012; TAMURA et al., 20015; ARENAS et al., 2016; CUNHA et al., 2016; CARVALHO et al., 2017).

O carprofeno é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) que reduz a liberação de prostaglandina via inibição da COX, e têm a capacidade de inibir seletivamente a COX-2 e, conseqüentemente, ação tanto na prevenção quanto no tratamento do câncer, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com diversas modalidades terapêuticas, como na quimioprevenção, quimioterapia antineoplásica, radioterapia ou como terapia única (LLORET et al., 2007; JOUBERT, 2009; DE NARDI et al., 2011; LAVALLE et al., 2012). Além disso, devido à sua inibição ser seletiva a COX-2, tem baixo potencial de efeitos colaterais.

O procedimento cirúrgico, realizado com ampla margem de segurança, é considerado o tratamento que confere maior sobrevida para cadelas com câncer de mama (CASSALI et al., 2014). A quimioterapia adjuvante é utilizada com o intuito de prevenir o desenvolvimento de metástases ou controlá-la, quando previamente existente (KARAYANNOPOULOU et al. 2001; MARCONATO et al., 2009; LAVALLE et al., 2012;

ARENAS et al., 2016). Na atualidade, relatos na literatura humana (ASHOK et al., 2011) e veterinária (LLORET et al., 2007) têm documentado a ação dos AINEs contra o câncer de mama.

O objetivo deste estudo foi comparar a progressão tumoral e a sobrevivência de cadelas diagnosticadas com tumores mamários avançados (T₃N₀₋₁M₀) submetidos ao tratamento cirúrgico associado ou não ao uso de inibidores da COX.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção das pacientes

Para a realização deste estudo foram selecionadas 20 cadelas com carcinoma mamário, em estágio III e IV, provenientes da rotina do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, atendidas no período de março de 2017 a abril de 2019. As pacientes foram divididas em 2 grupos: grupo tratado (n=10) e grupo controle (n=10).

Após a realização da anamnese e exame clínico das pacientes, o estadiamento foi realizado com base no volume da lesão primária (T), na extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N) e na presença ou ausência de metástases à distância (M). Foi realizada a mensuração do tamanho do(s) tumor(es), com auxílio de um paquímetro digital Digimess (Código 100.179Q 150mm/6”). A avaliação dos linfonodos foi realizada por meio de exames histopatológico. Exames de imagem, como radiografia torácica (projeção lateral direita, lateral esquerda e ventrodorsal) e ultrassonografia abdominal, foram realizados para pesquisar a presença de metástases. O estadiamento clínico dos neoplasmas mamários seguiu como preconizado pelo sistema TNM para os tumores mamários caninos (OWEN, 1980) (Apêndice C).

Além disto, todas as pacientes foram submetidas à avaliação laboratorial pré-operatória, envolvendo as análises de hemograma completo, bioquímica sérica avaliando alanina aminotransferase (ALT), creatinina (CREA) e ureia (URE), urinálise (Des urina) e relação proteína/creatinina urinária (UPC), para determinar a condição clínica geral antes da realização do procedimento cirúrgico.

Tratamento das pacientes

Após a realização do estadiamento do neoplasma e avaliação clínica das pacientes, foi realizado o procedimento cirúrgico. As mastectomias foram ser realizadas com amplas margens de segurança, sendo a exérese entre 1 a 3 centímetros de tecido normal perineoplásico. A técnica de mastectomia unilateral total foi a de escolha e, no caso da existência do envolvimento da cadeia contralateral, o mesmo procedimento foi realizado no lado oposto após 3 semanas da data da primeira cirurgia.

Princípios da cirurgia oncológica foram seguidos, como a remoção dos linfonodos regionais (axilar e inguinal). A identificação trans cirúrgica do linfonodo axilar foi realizada com o auxílio do azul patente, sendo este, administrado na região peritumoral, no espaço intradérmico, 10 a 15 minutos antes do início do procedimento cirúrgico, na dose de 2mg/kg, não ultrapassando o volume de 1ml por paciente.

No pós-operatório as pacientes receberam terapia antibiótica e analgésica de acordo com a necessidade individual. A limpeza da ferida cirúrgica foi realizada com

solução fisiológica (NaCl 0,9%). A remoção das suturas de pele foi realizada com 15 dias de pós-operatório, na ausência de complicações cirúrgicas.

A administração de carprofeno do grupo tratado teve início no pós-operatório imediato, na dose de 4,4mg/kg, por via oral, a cada 24 horas, durante 90 dias. As demais pacientes não receberam o inibidor da COX-2 (grupo controle). Concomitante ao emprego de carprofeno, foi administrado, uma vez ao dia, por via oral, omeprazol, na dose de 1mg/kg, para evitar possíveis alterações gástricas que possam ser induzidas pelo inibidor da COX-2.

Classificação histopatológica e imuno-histoquímica

Após a realização da mastectomia, foi efetuado o encaminhamento da peça cirúrgica para determinar a classificação histopatológica, realizadas pelo Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Toda a cadeia mamária (com linfonodos axilar e inguinal) foi avaliada e as amostras dos tumores, linfonodos e margens cirúrgicas foram fixadas em solução de formol a 10%, tamponada com fosfato, pH 7,2. Após o período de fixação de 24 a 48 horas, o material foi desidratado em álcool 70%, diafanizado e incluso em parafina histológica. Nos blocos obtidos foram realizados cortes semisseriados de cinco micrômetros de espessura, os quais foram corados pela hematoxilina-eosina e utilizados para observação em microscopia de luz, permitindo a confirmação do diagnóstico e classificação dos tumores, conforme disposto no Apêndice A.

Além disso, foi utilizada a técnica de imuno-histoquímica em cortes de glândula mamária incluídos em parafina, seguindo o protocolo do Laboratório de Análises Clínicas Veterinário VetPat, em Campinas, SP. Para sua análise, as amostras foram seccionadas em cortes de 5 µm de espessura e montadas em lâminas de vidro carregadas eletricamente, em seguida foram submetidas à desparafinização e hidratação. A seguir, procedeu-se com a recuperação antigênica com solução EDTA (Ph 8,9). A diluição do anticorpo primário foi de 1:200 para o COX-2, Clone (CX-294), Dako Agilent (Tabela 1). Como anticorpo secundário, foi utilizado o sistema de detecção de polímero (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems. Ref: RE7280-k). A avaliação da reação de imuno-histoquímica foi realizada com auxílio de um microscópio acoplado a câmera digital, juntamente com o programa de análise de imagens, considerando-se a quantidade e intensidade de células marcadas. O resultado para o anticorpo foi classificado em positivo e negativo, para respaldar a resposta ao tratamento aplicado.

Tabela 1: Anticorpo primário utilizado com suas especificações.

Anticorpo anti	Clone	Diluição	Fabricante
COX-2 (M)	CX-294	1:200	Dako Agilent

M: anticorpo monoclonal

Avaliação pós operatória e análise dos dados

No período pós-operatório as pacientes foram avaliadas mensalmente nos primeiros 6 meses. A avaliação foi por meio de exames físico e complementares (radiografia torácica, ultrassonografia abdominal, hemograma completo, bioquímica sérica, avaliando ALT, CREA e URE, Des urina e UPC), com o propósito de monitorar a

evolução da afecção neoplásica (presença ou ausência de recidiva e/ou metástase) e da toxicidade farmacológica.

Além disso, exames de imagem (radiografia torácica, ultrassonografia abdominal) foram realizados trimestralmente no período de 6 e 12 meses, para monitorar a evolução da afecção neoplásica e acompanhar a sobrevida.

Análise estatística

A análise de correspondência múltipla foi aplicada para verificar a existência de correspondências entre as categorias grupo, estadiamento, sinais clínicos, exames laboratoriais e exame ultrassonográfico pré-operatórios, idade, quantidade de nódulos, presença de ulceração, quantidade de tipos histopatológicos, grau histopatológico, expressão de COX-2, margem cirúrgica e tempo de sobrevida. O teste qui-quadrado foi utilizado para verificar associação entre essas categorias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$. Os softwares de análise utilizados foram o Statistica 7 e o Graphpad Prism 6.0.

RESULTADOS

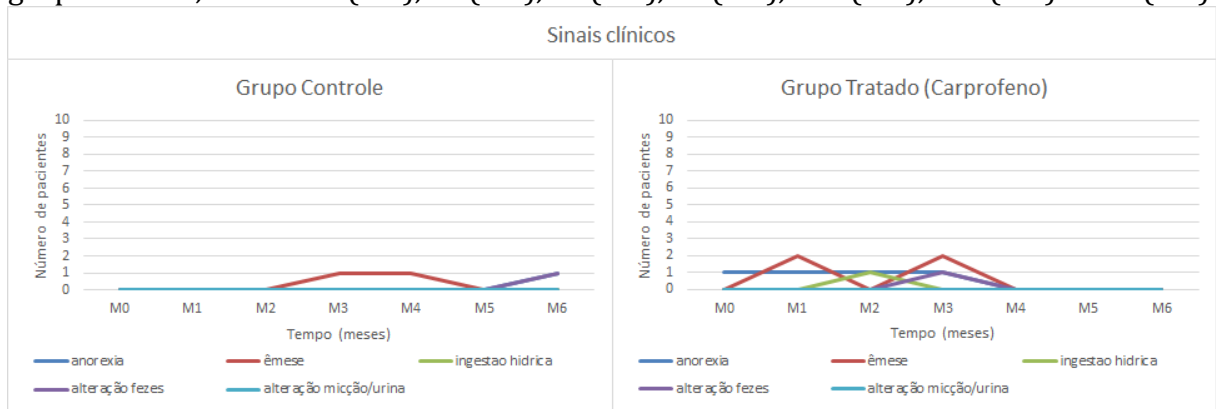
Em seis meses de acompanhamento, foram observados o total de quatro óbitos, sendo dois no grupo controle com o tempo de sobrevida de 110 /118 dias e dois no grupo do carprofeno com sobrevida de 87/133 dias. Houve dois óbitos entre 6 e 12 meses, ambos do grupo controle, os quais tiveram tempo de sobrevida de 240 e 243 dias.

As alterações clínicas, laboratoriais, ultrassonográficas e radiográficas, observadas no momento inicial (M0) e durante o acompanhamento de 6 meses (M1, M2, M3, M4, M5 e M6), estão no Quadro 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

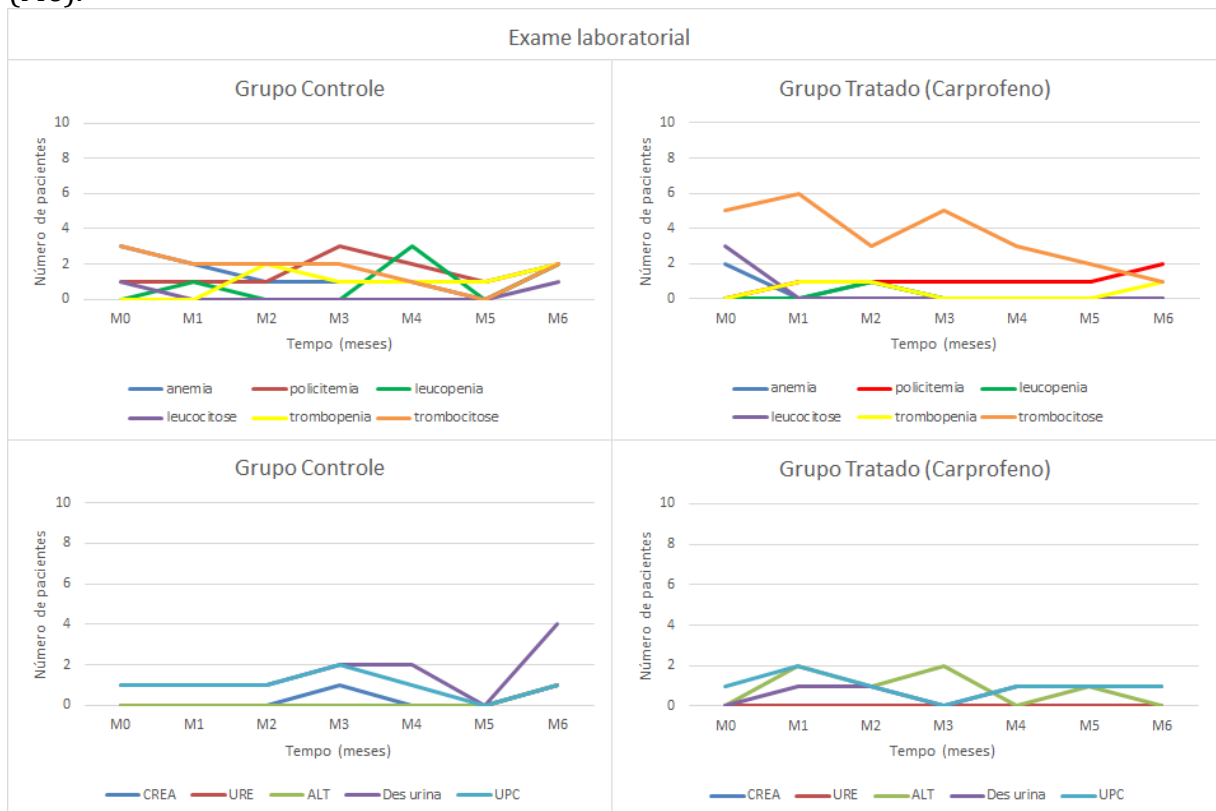
Em relação ao tempo livre de doença, observou-se surgimento de nódulos em diferentes órgãos, sendo suspeitos de metástases pois não tiveram confirmação histopatológica, os quais foram encontrados nos órgãos: três em pulmões; dois em fígado; dois em pele; dois em baço; e um em linfonodos.

As novas lesões nodulares (Quadro 3 e 4) foram observadas no grupo controle em cinco pacientes, sendo em uma com 60 dias (pele), em duas pacientes com 150 dias (fígado e pulmão) e três pacientes com 180 dias (baço, fígado e linfonodo esternal cranial), sendo que uma das pacientes teve alterações tanto com 150 dias (fígado) quanto com 180 dias (linfonodo esternal cranial) de acompanhamento. No grupo tratado, por sua vez, foram observadas lesões nodulares em três pacientes, sendo a primeira paciente com 60 dias (pele), a segunda paciente com 90 dias (pulmão) e com 120 dias (baço), e a terceira paciente com 180 dias (pulmão). Adicionalmente, no grupo controle, uma paciente apresentou nódulo no fígado no pré-operatório (M0), o qual foi realizado biopsia com agulha para biopsia de tecidos moles tipo *Tru-cut* guiada por ultrassom, resultando em degeneração por glicogênio associada a fibrose moderada. Os nódulos esplênicos observados desde o pré-operatório (M0) (3 no grupo controle e 2 no grupo tratado) foram acompanhados e permaneceram estáveis, sendo associados com hiperplasia esplênica benigna.

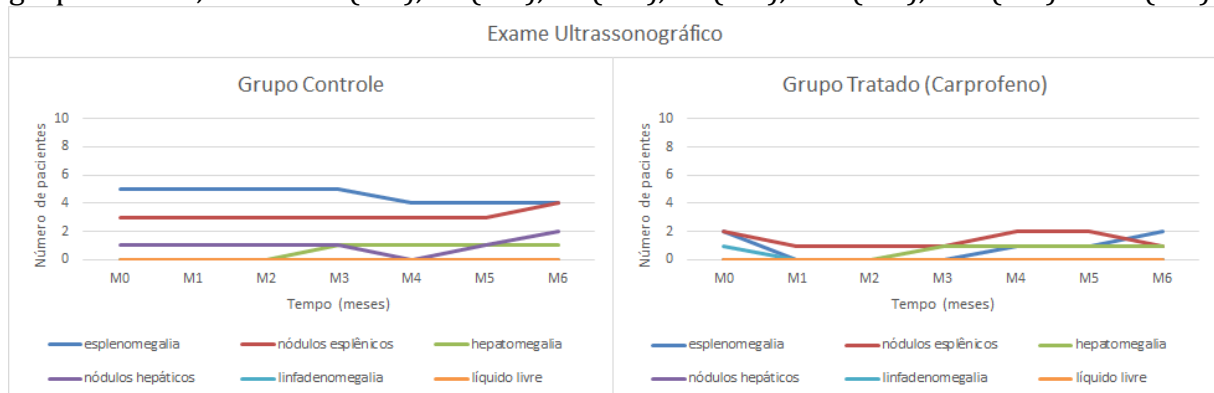
Quadro 1. Dados obtidos das alterações clínicas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado, nos dias 0 (M0), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5) e 180 (M6).



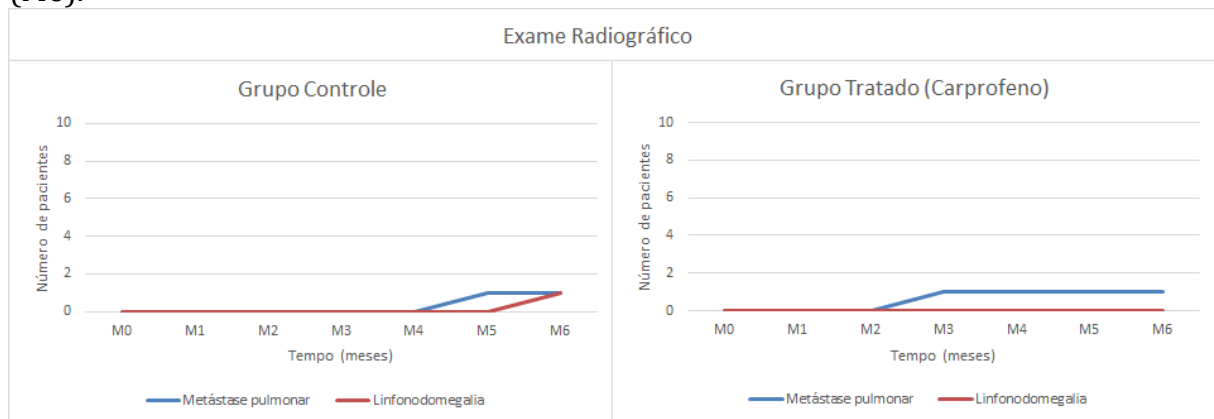
Quadro 2. Dados obtidos das alterações laboratoriais das pacientes do grupo controle e do grupo tratado, nos dias 0 (M0), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5) e 180 (M6).



Quadro 3. Dados obtidos das ultrassonográficas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado, nos dias 0 (M0), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5) e 180 (M6).



Quadro 4. Dados obtidos das alterações radiográficas das pacientes do grupo controle e do grupo tratado, nos dias 0 (M0), 30 (M1), 60 (M2), 90 (M3), 120 (M4), 150 (M5) e 180 (M6).



Entre as pacientes, as quais apresentaram 79 nódulos mamários, foram observados 100 diagnósticos histopatológicos (variando de 1 a 11 por paciente), representados pelo adenoma basaloide, adenoma tubular, adenomioepitelioma benigno, adenomioepitelioma maligno, carcinoma anaplásico, carcinoma apócrino ductal, carcinoma cribriforme, carcinoma de células escamosas mamário, carcinoma ductal in situ, carcinoma em tumor misto, carcinoma lobular in situ, carcinoma micropapilar, carcinoma papilar, carcinoma secretório, carcinoma tubular in situ, carcinoma tubular, mastocitoma cutâneo, papiloma ductal e tumor misto benigno, na frequência relatada na Figura 1.

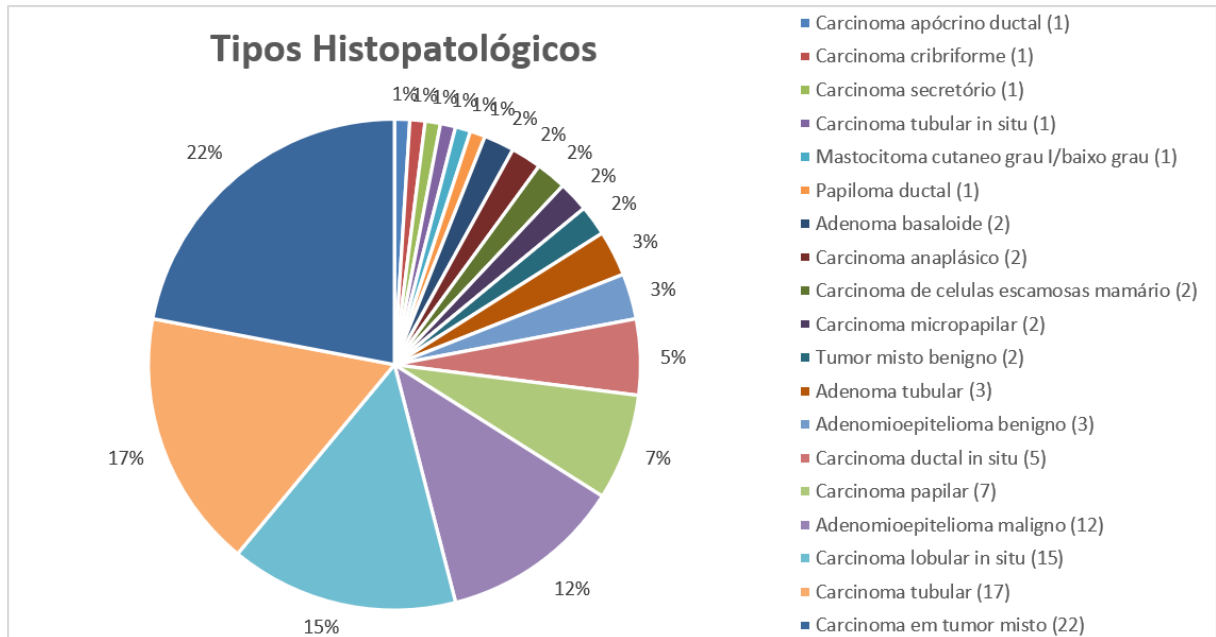


Figura 1. Percentual dos tipos histológicos diagnosticados na amostra avaliada em pacientes fêmeas da espécie canina. UNESP – Câmpus de Jaboticabal (2020).

Expressão de COX-2 (Figura 2) foi de 70%, sendo entre o grupo controle 80% positivo e no grupo tratado 60% positivo. Entre as pacientes com estadiamento IV, 100% foram positivas e estadiamento III, 50% foram positivas.

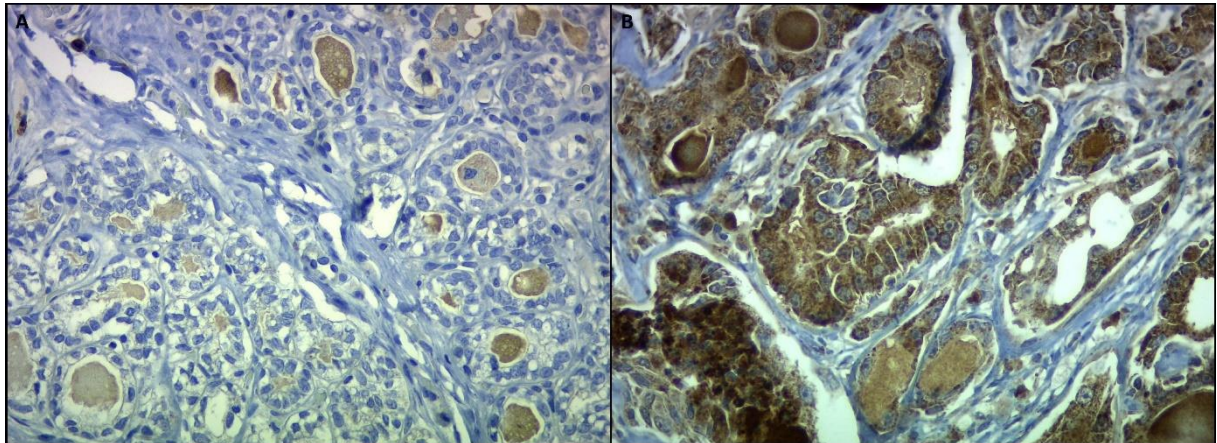


Figura 2. Expressão de COX-2 em neoplasmas mamários em cadelas. **A:** Ausência de imunopositividade de COX-2 nas células neoplásicas epiteliais. **B:** Imunopositividade de COX-2 nas células neoplásicas epiteliais.

Pela análise de correspondência múltipla (Figura 3), em pacientes que tinham 10 a 11 anos no momento do diagnóstico, observou-se que essas foram associadas àquelas que menos apresentaram alterações com exames de imagem, carcinoma grau I e ausência de expressão de COX-2. Observou-se também associação entre pacientes que apresentaram carcinoma grau I e ausência de expressão de COX-2 ($p=1$).

Observou-se a associação de pacientes com tumores de índice mitótico intermediário (entre 9 e 16 figuras de mitose em 10 CGA) com as diagnosticadas aos 8 e 9 anos de idade. Pacientes que apresentaram sobrevida entre 6 e 12 meses foram

associadas àquelas com a apresentação de nódulo único e com tumores de índice mitótico intermediário (entre 9 e 16 figuras de mitose em 10 CGA) ($p=1$).

Pelo teste qui-quadrado, observou-se que o parâmetro índice mitótico analisado no exame histopatológico pode ser capaz de segregar grupos de sobrevida ($p=0,06$).

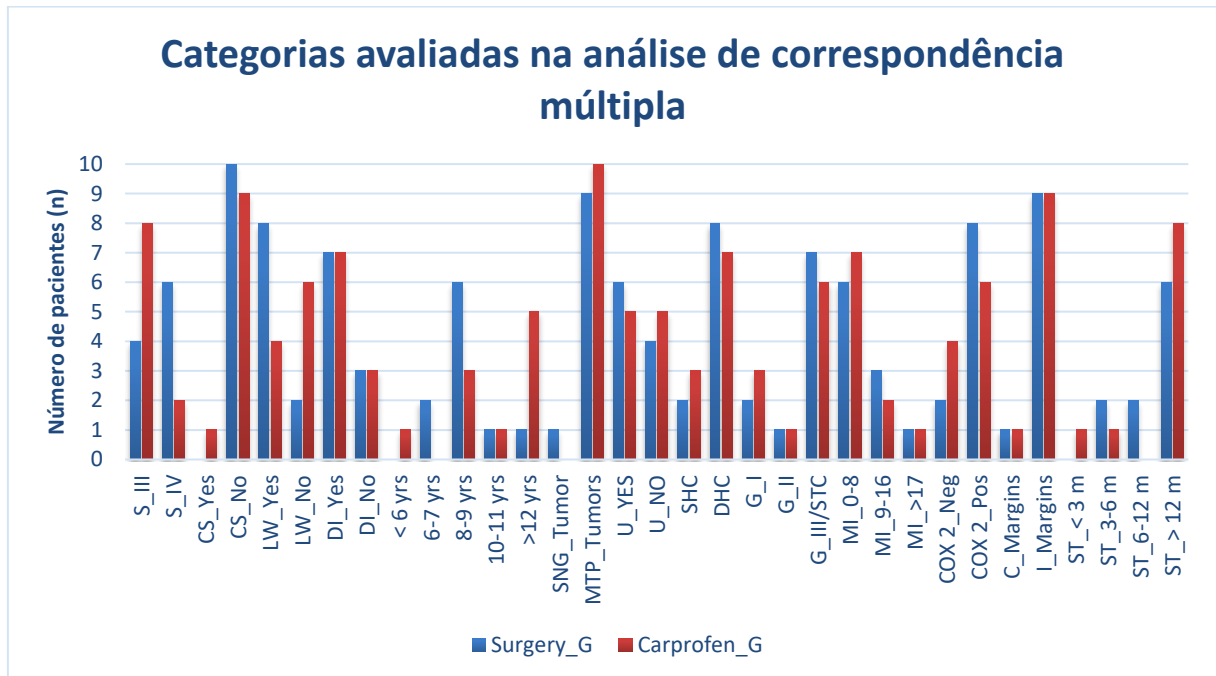


Figura 3. Categorias avaliadas na análise de correspondência múltipla. Surgery_G = Grupo controle (cirurgia); Carprofen_G = Grupo tratado (carprofeno); S = estadiamento clínico; LW = exames laboratoriais; CS = sinais clínicos; DI = exames de imagem; yrs = anos; SNG_tumor = tumor único; MTP_Tumor = múltiplos tumores; U_YES = tumor ulcerado; U_No = tumor não ulcerado; DHC=diferentes diagnósticos histopatológicos; SHC = único diagnóstico histopatológico; G = mrau histológico; STC = tipo especial de carcinoma; COX_Neg = COX-2 negativo; COX_Pos = COX-2 positivo; C_Margins = Margens cirúrgicas livres; I_Margins = Margens cirúrgicas comprometidas; ST = tempo de sobrevida.

DISCUSSÃO

Pacientes caninos que apresentam neoplasmas mamários com estadiamento clínico avançado possuem indicação para o uso de tratamento adjuvante, com o intuito de alcançar o melhor controle da doença e maior sobrevida (MARCONATO et al., 2009; LAVALLE et al., 2012). A pesquisa do uso de medicamentos nos quais possui um alvo terapêutico, com base nas características imunofenotípicas da doença, é uma tendência emergente. Dentre as possibilidades de tratamento baseado por um fator preditivo, a expressão da COX-2 é uma opção a ser considerada (CUNHA et al., 2016).

A COX-2 tem sido relacionada com pior prognóstico, de forma independente ou dependente, principalmente em relação aos carcinomas (DE NARDI, 2007; DIAS PEREIRA et al., 2009; LAVALLE et al., 2009; LAVALLE et al., 2012). No presente estudo, no qual apenas pacientes em estágio III e IV foram incluídas, 70% apresentaram marcação positiva para COX-2. Considerando as demais variáveis ao comparar os resultados entre os estudos, Lavalle e colaboradores (2012) detectou 96,6% de positividade para COX-2 em seus pacientes, sendo casos de neoplasma mamário em estágios mais avançados,

incluindo o estágio IV e V (T₃N₁₋₂M₀₋₁), o que segue o raciocínio da maior porcentagem de marcação em estágios avançados e, proporcionalmente, pior prognóstico. Além disso, De Nardi (2007) e Dias Pereira et al. (2009) constataram expressão aumentada da COX-2 na maioria das lesões metastáticas estudadas.

Outros estudos revelam diferentes valores da expressão de COX-2, sendo estes, avaliados entre os tumores mamários benignos, foi de 8% (DIAS PEREIRA et al., 2009), 24% (DORE et al., 2003), 25% (DE NARDI, 2007) e 96% (QUEIROGA et al., 2007), sendo entre os que avaliaram os tumores malignos, foi de 42% (DIAS PEREIRA et al., 2009), 56% (DORE et al., 2003; HELLER et al., 2005), 62% (MOHAMMED et al., 2004) e 100% (MILLANTA et al., 2006; QUEIROGA et al., 2007; LAVALLE et al., 2009; QUEIROGA et al., 2010; ARENAS et al., 2016), e entre o que considerou apenas os carcinomas grau III, foi de 85% (CLEMENTE et al., 2013). A marcação da expressão de COX-2 avaliada nos estudos citados variou tanto na porcentagem de células tumorais positivas para COX-2, assim como na intensidade da expressão, o qual não foi avaliado no presente estudo.

Os tipos histológicos encontrados neste estudo foram consideravelmente diversificados, o que ocorre constantemente em estudos clínicos com tumores mamários e é fator limitante na análise dos seus resultados. Apesar do tipo histológico ser um fator prognóstico, todos os pacientes encontravam em estágio clínico avançado (estadiamento III ou IV), o que corrobora ao prognóstico, impactando no resultado geral de sobrevivência das pacientes. Dentre os tipos histológicos, Heller e colaboradores (2005) identificaram o carcinoma anaplásico como significativamente mais propenso a ter marcação para COX-2, observando em 100% dos casos deste tipo em seu estudo (11 casos), e, de forma semelhante, neste estudo observou expressão de COX-2 em 100% dos casos deste tipo (2 casos).

A associação feita neste estudo entre cadelas com carcinomas grau I com a ausência de marcação de COX-2 corrobora com os achados de Heller e colaboradores (2005), os quais indicam que tumores pouco diferenciados expressam COX-2 em maior frequência em comparação com tumores mais diferenciados. Resultados semelhantes são observados também na literatura humana (RISTIMÄKI et al., 2002; REGULSKI et al., 2016). Este padrão reforça a indicação dos AINEs como quimioterapêuticos no tratamento adjuvante do neoplasma mamário canino, os quais são indicados apenas em casos com um conjunto de fatores prognósticos negativos, além disso, outros mecanismos independentes da expressão de COX-2 o indica como quimioprevenção, avaliados *in-vitro* (TAMURA et al., 2005; ITURRIAGA et al., 2017; BICHOP et al., 2018).

De acordo com LAVALLE e colaboradores (2012), inibidores seletivos da COX-2 podem beneficiar pacientes com altos escores de imunoexpressão da COX-2. Desta forma, no presente estudo as pacientes selecionadas com carcinoma em estágio avançado (estádio III e IV) possuem maior probabilidade em expressar a COX-2, observado na maioria dos pacientes (60%), qualificando-as como candidatas à terapia direcionada com inibidores seletivos da COX-2. Sendo assim, recomenda-se que o escore imuno-histoquímico da COX-2 seja incluído como fator preditivo na avaliação de neoplasmas mamários caninas com estadiamento clínico avançado.

Além disso, a avaliação do benefício terapêutico da inibição da COX-2 em tumores mamários é necessária antes de recomendá-los como tratamento. Neste caso, 60% das pacientes tratadas com AINEs expressavam de fato o COX-2, o que diretamente interfere no resultado das pacientes que não apresentaram sua expressão e foram tratadas com o carprofeno.

Pacientes caninas com neoplasma mamário em estágios avançados recebem a indicação de tratamento adjuvante após ao procedimento cirúrgico para melhor controle da doença, sendo observado o seu benefício em diversos estudos (KARAYANNOPOULOU et al. 2001; MARCONATO et al., 2009; LAVALLE et al., 2012; ARENAS et al., 2016). Entretanto, há outros estudos em que sua indicação não foi comprovada (MARCONATO et al., 2008; SIMON et al., 2006; TRAN et al., 2016). Apesar do presente estudo não ter tido força estatística para identificar diferença entre os grupos, Arenas e colaboradores (2016) observaram que cadelas com tumores mamários tratados cirurgicamente seguido por AINEs (firocoxibe) tiveram tempo livre de doença e sobrevida maior do que aquelas tratadas apenas com o procedimento cirúrgico.

Os estudos encontrados na literatura caracterizam a falta de uniformidade no tratamento dos AINEs, a respeito da sua duração, a qual pode ser observada de 1 a 24 meses de administração (ARENAS et al., 2016; CUNHA et al., 2016). Entretanto, com o propósito de controlar a recidiva e a progressão tumoral, indica-se o emprego dos AINEs forma prolongada, uma vez que os inibidores seletivos da COX-2 são capazes de inibir a ativação do receptor, mas não modula a expressão do receptor (CUNHA et al., 2016). Sua prescrição (dose terapêutica e duração do tratamento), no entanto, devem ser adaptadas à suscetibilidade de cada paciente para minimizar os eventos adversos, principalmente naqueles que apresentam comorbidades. No presente trabalho, o tratamento teve duração de 3 meses e não houve necessidade de ajustes de dose ou duração.

O carprofeno pertence a classe dos AINEs, sendo um ácido carboxílico conhecido como ácido aril-propiónico, com características analgésicas e antipiréticas. Seu uso é uma alternativa promissora no tratamento de cães e gatos, pois possui ação seletiva sobre a COX-2, diminuindo seu potencial tóxico quando comparado à outras classes (GUÉRIUS et al., 2002). Seu mecanismo de ação ocorre principalmente pelo efeito na liberação de prostaglandinas (PIMPÃO et al., 2009). A escolha do seu uso no estudo foi pela sua seletividade visando minimizar os possíveis efeitos colaterais, os quais foram mínimos e permitiram que o período de administração seja concluído sem interrupções.

Atualmente, relatos na literatura humana (CHOW et al., 2005; ASHOK et al., 2011) e veterinária (LLORET et al., 2007) têm documentado a ação dos diversos AINEs contra o câncer de mama, por meio da capacidade de inibir a COX-2 e, conseqüentemente, diversos mecanismos associados com o desenvolvimento deste neoplasma. Apesar dos resultados não constatarem que o seu uso foi capaz de influenciar na sobrevida ou na progressão tumoral, a alta expressividade do COX-2 nos tumores mamários das cadelas do presente estudo justificaram sua indicação.

Após serem utilizados no tratamento da inflamação, febre e dor, os inibidores da COX-2 estão sendo desenvolvidos como potenciais agentes para a prevenção e tratamento do câncer em humanos e animais. Os AINEs seletivos para COX-2 desenvolvidos para uso no tratamento dos neoplasmas por apresentarem efeito antitumoral mais potente que os AINEs não seletivos (ASHOK et al., 2011) e nível de segurança muito maior em relação ao desencadeamento de efeitos colaterais. A respeito dos tumores mamários em mulheres, inibidores seletivos da COX-2 foram mais protetoras do que os não seletivos, com destaque ao rofecoxib, o qual reduziu o risco de câncer de mama em 46%, sugerindo um possível papel dos inibidores seletivos para COX-2 na profilaxia do câncer de mama (ASHOK et al., 2011). As estratégias de tratamento que utilizam a inibição da COX-2 têm demonstrado ação preventiva e terapêutica em modelos animais com câncer espontâneo

e experimental (ROSSMEISL et al., 2009). Nesse sentido, o estudo buscou contribuir para seu uso de forma terapêutica em cadelas com neoplasma mamário espontâneo.

Estudos acerca dos efeitos colaterais do AINEs, os quais são presentes no trato gastrointestinal, rins, fígado e na função hemostática. Entretanto, em termos comparativos, deve-se considerar a classe do fármaco em questão, sendo o carprofeno um dos AINEs que desenvolvem uma atividade inibitória seletiva sobre a COX-2. Os efeitos específicos do carprofeno também são avaliados isoladamente na literatura.

As lesões gastrintestinais constituem as principais complicações após o uso por períodos prolongados de AINEs. Para verificar seus efeitos em cães, Guérius e colaboradores (2002) avaliaram via endoscopia a administração de carprofeno e vedaprofeno e constataram que podem ser administrados com segurança, durante o período de 30 dias consecutivos, pois causaram mínimas alterações gástricas em 1 (14%) e 2 (28%) das pacientes tratadas, respectivamente. Resultante da inibição das prostaglandinas, úlceras gástricas podem ocorrer decorrente do uso de AINEs, pois elas atuam no estímulo na secreção de muco e bicarbonato no estômago e na inibição da secreção de gastrina e ácido clorídrico (GUÉRIUS et al., 2002). Outro estudo, conduzido por Luna e colaboradores (2007), comparou os efeitos no trato gastrointestinal, e observou que o uso carprofeno, administrado por 90 dias em cães, causa menos lesão no quando comparado ao cetoprofeno e flunixin meglumine. Neste estudo as alterações gástricas observadas foram hiporexia/anorexia, oligodipsia/adipsia, êmese e diarreia e em nenhum dos casos foi necessário interromper o tratamento, entretanto, além do uso do carprofeno, as pacientes deste estudo podem ter apresentado alterações devido ao neoplasma.

Dos efeitos adversos do uso dos AINEs, as renais são as segundas mais relatadas (LOMAS et al., 2015). Para avaliar a toxicidade renal do carprofeno e do ibuprofeno, bem como sua reversibilidade, um estudo utilizou durante 8 dias isoladamente e concomitantemente com a presença de depleção volumétrica do plasma com o uso de diuréticos (furosemida), sendo observado que cães normovolêmicos que receberam isoladamente AINES não diferiram daqueles do grupo placebo, entretanto, quando associados à diuréticos, podem comprometer a taxa de filtração glomerular e comprometer a função renal, a qual foi autolimitante com a interrupção da administração. (SURDYK et al., 2011). Sabe-se que cães com doença renal crônica expressam mais COX-2 que os hígidos, sendo assim, sendo mais afetados pelo uso dos AINEs (mesmo os seletivos), influenciando no fluxo sanguíneo renal, na taxa de filtração glomerular, na liberação de renina e na excreção de sódio (LOMAS et al., 2015). As pacientes do presente estudo que foram tratadas com carprofeno não tiveram alterações nas dosagens de ureia e creatinina sanguínea e, apesar de ter sido identificada alterações na mensuração da densidade urinária e no UPC em 3 pacientes, foram autolimitantes (inclusive durante a administração do carprofeno) e não necessitaram de interrupção da administração. Além disso, as pacientes deste estudo podem ter apresentado alterações devido ao câncer.

Outros efeitos colaterais são relatados, como a hepatotoxicidade com o uso do carprofeno, sendo o aumento na atividade sérica da aminotransferase (ALT) a anormalidade clínico-patológica mais frequente, mesmo sem correlação com os sinais clínicos (CAVALCANTE et al., 2008). No presente estudo, apesar do agravante da doença neoplásica, foi observado o aumento da ALT em três pacientes (30%) do grupo tratado e em uma paciente (10%) do grupo controle, e assim como o estudo descrito, não houveram

correlações clínicas e o aumento foi autolimitante, inclusive durante a administração do carprofeno.

Em um estudo conduzido por Cunha e colaboradores (2016), no qual o uso de AINEs foi aplicado a vários tipos tumorais, 2 (29%) dos pacientes tratados com firocoxibe apresentaram vômito, anorexia, diarreia e fezes escuras, os quais foram relacionados à doença gastrointestinal preexistente, agravada com o uso de AINE. Entretanto, a duração do tratamento não foi uniforme entre os pacientes, sendo, em média, de 3,2 meses (variação de 1 a 6), bem como não houve uso de apenas um fármaco, sendo utilizado firocoxibe e mavacoxibe. As alterações do trato gastrointestinal no grupo tratado com carprofeno deste estudo foram observadas em quatro pacientes, sendo hiporexia/anorexia (três pacientes, no M2 no M3), êmese (três pacientes, no M1, M2 e M3), oligodipsia/adipsia (uma paciente no M2), e diarreia (uma paciente no M3). Além de uma paciente apresentar alteração no M0 (hiporexia/anorexia), ou seja, previamente ao tratamento cirúrgico e com carprofeno. Entretanto, no presente estudo as alterações gástricas observadas em uma das pacientes as alterações foram atribuídas à doença preexistente (hemoparasitose), devido à resposta terapêutica satisfatória, e em outra paciente foi atribuída à ingestão acidental de alimento inapropriado para cães, devido à ocorrência pontual e autolimitante. Outra paciente apresentou sinais clínicos associados à evolução da doença (carcinoma inflamatório secundário), antecedentes ao óbito. Paralelamente, foram observadas no presente estudo alterações clínicas no grupo controle, como êmese (duas pacientes no M3 e M4) e diarreia (uma paciente no M6).

No grupo de pacientes estudado por Marconato e colaboradores (2009), foi observado toxicidade gastrointestinal em 1 (4%) paciente que recebeu apenas piroxicam e em 1 (50%) que recebeu piroxicam e doxorrubicina e, de forma geral, os autores sugerirem que o tratamento clínico pode melhorar o resultado geral do carcinoma inflamatório mamário. Em outro estudo, os efeitos colaterais observados por Schmidt e colaboradores (2001) em um grupo de cães com carcinoma de células escamosas oral com piroxicam foi em apenas 1 (6%) paciente, o qual desenvolveu toxicidade gastrointestinal moderado, responsiva ao tratamento sintomático. Lavallo e colaboradores (2012) utilizaram firocoxibe e piroxicam no tratamento de carcinoma mamário canino e não observaram efeito colateral com firocoxibe, entretanto, relataram óbito de uma paciente, a qual utilizou piroxicam, devido a gastroenterite hemorrágica aguda não responsiva ao tratamento clínico (hidratação, antieméticos, manejo dietético e inibidores de ácido gástrico). No presente estudo não houve necessidade de interromper nenhum tratamento devido aos efeitos colaterais, sendo autolimitante, inclusive durante o uso do carprofeno.

Arenas e colaboradores (2016) conduziram um estudo no qual observaram 28% de efeito colateral relacionado ao uso do firocoxibe (utilizado durante 11 a 24 meses), em contraste com 75% ao uso da mitoxantrona, o que torna o uso dos AINEs vantajoso frente à quimioterapia dose máxima tolerada, visto que seu uso foi responsivo ao tratamento clínico. Dentre os efeitos colaterais do uso do AINEs, anorexia foi observada em dois cães (29%), além de aumento da ureia em dois cães (29%) e a creatinina (não ultrapassando os limites de referência) em dois cães (29%) durante o período do estudo, sendo tratados clinicamente com sucesso. No presente estudo, foi observada anorexia em três pacientes (30%) que receberam carprofeno e em uma (10%) que não recebeu, além disso, não foi observado aumento de ureia nem de creatinina nas pacientes que receberam carprofeno, apesar de ter sido observado aumento de ureia em uma paciente (10%) e aumento de creatinina em duas (20%) que não receberam.

Um resumo com resultados preliminares publicado por Lloret e colaboradores (2007) avaliou 60 pacientes com câncer, entre os quais 29 eram mamários, cujo objetivo era avaliar a tolerância do firocoxibe em cães com neoplasmas que frequentemente expressam COX-2, demonstrou boa tolerância à administração de firocoxibe por período prolongado, observando efeitos colaterais em apenas dois (3%) casos.

Neste estudo, observaram-se algumas alterações no grupo tratado com carprofeno, entretanto, foram brandas e autolimitantes ao período de utilização (3 meses), não necessitando de intervenção ou interrupção do tratamento. Além disso, algumas alterações foram atribuídas à situações externas. Paralelamente, foram observadas alterações clínicas no grupo controle. Desta forma, não foi possível atribuir as alterações clínicas ao uso do carprofeno. Semelhantemente, não foi possível atribuir as alterações laboratoriais à algum dos grupos deste estudo.

CONCLUSÕES

Apesar da impossibilidade em mostrar melhora nos tempos de sobrevivência em cães com neoplasma mamário avançado, tratados com carprofeno de forma adjuvante, a expressão de COX-2 identificada na maioria das pacientes (70%) suporta a indicação da terapia anti-inflamatória. A incorporação de biomarcadores na tomada de decisão clínica é cada vez mais importante na oncologia veterinária, para praticar a terapia individualizada, e assim, predizer os pacientes que irão ou não responder ao tratamento.

Os recentes avanços alcançados no campo da oncologia veterinária com o emprego dos inibidores de COX-2 representam nova tendência na investigação do tratamento do câncer em animais de companhia, sendo o carprofeno seguro para a utilização por períodos prolongados (90 dias) em cães.

REFERÊNCIAS

- ALENZA, P.; PEÑA, L.; CASTILLO, N. et al. Factors influencing the incidence and prognosis of canine mammary tumors. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, p.287-291, 2000.
- ARENAS, C.; PEÑA, L.; GRANADOS-SOLER, J. L.; PÉREZ-ALENZA, M. D. Adjuvant therapy for highly malignant canine mammary tumours: Cox-2 inhibitor versus chemotherapy: a case-control prospective study. **Veterinary Record**, p. vetrec-2015-103398, 2016.
- BISHOP, B. F.; NGO, S. N. Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs as Chemopreventive Agents: Evidence from Cancer Treatment in Domestic Animals. **Annual Research & Review in Biology**, p. 1-13, 2018.
- BRITO, E. S. A.; SANTOS, A. S.; SANTIN, A. P. I. et al. Avaliação retrospectiva de tumores mamários caninos encaminhados ao setor de patologia animal/EVZ-UFG no período de janeiro de 2007 até abril de 2013. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, (supl.2) RESUMO 200, 2013.
- CARVALHO, M. I.; PIRES, I., PRADA, J.; RAPOSO, T. P.; GREGÓRIO, H.; LOBO, L.; QUEIROGA, F. L. High COX-2 expression is associated with increased angiogenesis, proliferation and tumoural inflammatory infiltrate in canine malignant mammary tumours: a multivariate survival study. **Veterinary and comparative oncology**, v. 15, n. 2, p. 619-631, 2017.

CAVALCANTE, L. F. H.; MARQUES, J. M. V.; GOUVÊA, A. S.; CONTESINI, E. A. Intoxicação por carprofeno em cães–artigo de revisão. *Revista da FZVA*, v. 15, n. 1, 2008.

CASSALI, G. D.; LAVALLE, G. E.; FERREIRA, E. et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors - 2013. ***Brazilian Journal of Veterinary Pathology***, v. 7, n. 2, p. 38 – 69, 2014.

CHANG, S. C.; CHANG, C. C.; CHANG, T. J. et al. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). ***Journal of the American Veterinary Medical Association***, v. 227, n. 10, p. 1625-1629, 2005.

CHOW, L. W. C.; LOO, W. T. Y.; TOI, M. Current directions for COX-2 inhibition in breast cancer. ***Biomedicine & pharmacotherapy***, v. 59, p. S281-S284, 2005.

CLEMENTE, M.; SÁNCHEZ-ARCHIDONA, A. R.; SARDÓN, D.; DÍEZ, L.; MARTÍN-RUIZ, A.; CACERES, S. et al. Different role of COX-2 and angiogenesis in canine inflammatory and non-inflammatory mammary cancer. ***The Veterinary Journal***, v. 197, n. 2, p. 427-432, 2013.

CUNHA, R. M. D. C.; HORTA, R. D. S.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B. Cyclooxygenase-2 expression in epithelial neoplasms and its relevance as a targeted therapy in dogs. ***Ciência Rural***, v. 46, n. 6, p. 1050-1052, 2016.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A. et al. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães. ***Archives of Veterinary Science***, v.7, p.15-26. 2002.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; ROCHA, N. S. et al. Neoplasias mamárias. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. ***Oncologia em Cães e Gatos***, 1. ed. São Paulo: Roca, 2009. cap. 25, p. 372-383.

DE NARDI, A.B.; DALECK, C. R.; AMORIM, R. L. et al. Immunoeexpression of cyclooxygenase-2 in mammary neoplasia in dogs. ***Selecciones Veterinary***, v. 15, p. 9-13, 2007.

DE NARDI, A.B.; RAPOSO, T. M. M.; HUPPES, R. R. et al. COX-2 inhibitors for cancer treatment in dogs. ***Pakistan Veterinary Journal***, v. 31, n. 4, p. 275-279, 2011.

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

GUÉRIUS, S. D.; SPREA, G.; DECONTO, I. et al. Exame gastroscópico após administração oral de anti-inflamatórios não esteroidais em cães. ***Archives of Veterinary Science***, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 53-58, 2002.

HELLER, D. A.; CLIFFORD, C. A.; GOLDSCHMIDT, M. H.; HOLT, D. E.; SHOFER, F. S.; SMITH, A.; SORENMO, 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.

- LAVALLE, G. E.; BERTAGNOLLI, A. C.; TAVARES, W. L. et al. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. **Veterinary Pathology**, v. 46, n.6, p. 1275-1280, 2009.
- LAVALLE, G. E.; CAMPOS, C. B.; BERTAGNOLLI, A. C. et al. Canine malignant mammary gland neoplasias with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In Vivo**, v. 26, p. 375-9, 2012.
- LOMAS, A. L.; GRAUER, G. F. The renal effects of NSAIDs in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 51, n. 3, p. 197-203, 2015.
- OLIVEIRA FILHO, J. C.; KOMMERS, G. D.; MASUDA, E. K. et al. Estudo retrospectivo de 1.647 tumores mamários em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 177-185, 2010.
- OLIVEIRA, L. O.; OLIVEIRA, R. T.; LORETTI, A. P. et al. Aspectos epidemiológicos da neoplasia mamária canina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 105-110, 2003.
- OWEN, L. N. TNM classification of tumors in domestic animals. **World Health Organization**, Geneva, p. 26-32, 1980.
- PRIEBE, A. P. S.; RIET-CORREA, G.; PAREDES, L. J. A. et al. Ocorrência de neoplasias em cães e gatos da mesorregião metropolitana de Belém, PA entre 2005 e 2010. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1583-1586, 2011.
- SIMON, D.; SCHOENROCK, D.; BAUMGÄRTNER, W.; NOLTE, I. Postoperative adjuvant treatment of invasive malignant mammary gland tumors in dogs with doxorubicin and docetaxel. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 20, n. 5, p. 1184-1190, 2006.
- SORENMO, K. Canine mammary gland tumours. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v. 33, p. 573-596, 2003.
- SURDYK, K. K.; SLOAN, D. L.; BROWN, S. A. Evaluation of the renal effects of ibuprofen and carprofen in euvoletic and volume-depleted dogs. **International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 130, 2011.
- TORÍBIO, J. M. M. L.; LIMA, A. E.; FILHO, E. F. M. et al. Caracterização clínica, diagnóstico histopatológico e distribuição geográfica das neoplasias mamárias em cadelas de Salvador, Bahia. **Revista Ceres**, v. 59, n. 4, p. 427-433, 2012.
- TRAN, C. M.; MOORE, A. S.; FRIMBERGER, A. E. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary and comparative oncology**, v. 14, n. 3, p. 252-262, 2016.
- ASHOK, V.; DASH, C.; ROHAN, T. E.; SPRAFKA, J. M.; TERRY, P. D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and breast cancer risk. **Breast**, v. 20, n. 1, p. 66-70, 2011.

DE NARDI, A. B. **Correlação da cicloxigenase-2 com Ki-67, P53 e Caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas**. 2007. 92p. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2007.

DIAS PEREIRA, P.; LOPES, C. C.; MATOS, A. J.; SANTOS, M.; GÄRTNER, F.; MEDEIROS, R.; LOPES, C. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. **Journal of the Comparative Pathology**, v. 140, n. 4, p. 247-253, 2009.

ITURRIAGA, M. P.; PAREDES, R.; ARIAS, J. I.; TORRES, C. G. Meloxicam decreases the migration and invasion of CF41. Mg canine mammary carcinoma cells. *Oncology Letters*, v. 14, n. 2, p. 2198-2206, 2017.

JOUBERT, K. E. The effects of firocoxib (Previcox) in geriatric dogs over a period of 90 days. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 80, n. 3, p. 179-84, 2009.

KARAYANNOPOULOU, M.; KALDRYMIDOU, E.; CONSTANTINIDIS, T. C.; DESSIRIS, A. Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 48, n. 2, p. 85-96, 2001.

KHWAJA, F. S.; QUANN, E. J.; PATTABIRAMAN, N.; WYNNE, S.; DJAKIEW, D. Carprofen induction of p75NTR-dependent apoptosis via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in prostate cancer cells. **Molecular cancer therapeutics**, v. 7, n. 11, p. 3539-3545, 2008.

LLORET A.; ACEÑA M. C.; PLANELLAS M., PASTOR J.; DEL CASTILLO N.; CARTAGENA J. C. et al. Resultados preliminares con el uso de firocoxibe en 60 neoplasias caninas. **Southern European Veterinary Conference (SEVC)**. 42º Congreso Nacional AVEPA. Barcelona, 2007.

LUNA, S.P., BASILIO, A.C., STEAGALL, P.V., MACHADO, L.P., MOUTINHO, F.Q., TAKAHIRA, R.K., BRANDAO, C.V. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n.3, p.258-264, 2007.

MARCONATO, L.; LORENZO, R. M.; ABRAMO, F.; RATTO, A.; ZINI, E. Adjuvant gemcitabine after surgical removal of aggressive malignant mammary tumours in dogs. **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 90-101, 2008.

MARCONATO, L.; ROMANELLI, G.; STEFANELLO, D.; GIACOBONI, C.; BONFANTI, U.; BETTINI, G. et al. Prognostic factors for dogs with mammary inflammatory carcinoma: 43 cases (2003–2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 235, n. 8, p. 967-972, 2009.

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 for molecular markers. **Breast cancer research and treatment**, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.

MOHAMMED, S. I.; KHAN, K. N. M.; SELLERS, R. S.; HAYEK, M. G.; DENICOLA, D. B.; WU, L. et al. Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 70, n. 5, p. 479-483, 2004.

PIMPÃO, C. T.; MONTANHA, F. P.; BUDZIAK, C.; LIMA, L. Â.; CAPRIGLIONE, L. G. A.; FIGUEIREDO, M.; MIKOS, P. Avaliação do carprofeno e do meloxicam como antipiréticos em cães. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 7, n. 3, p. 331-339, 2009.

QUEIROGA, F. L.; ALVES, A.; PIRES, I.; LOPES, C. Expression of Cox-1 and Cox-2 in canine mammary tumours. **Journal of comparative pathology**, v. 136, n. 2-3, p. 177-185, 2007.

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. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 3, p. 441-445, 2010.

TAMURA, D.; SAITO, T.; MURATA, K.; KAWASHIMA, M.; ASANO, R. Celecoxib exerts antitumor effects in canine mammary tumor cells via COX-2-independent mechanisms. **international journal of oncology**, v. 46, n. 3, p. 1393-1404, 2015.

REGULSKI, M.; REGULSKA, K.; PRUKAŁA, W.; PIOTROWSKA, H.; STANISZ, B.; MURIAS, M. COX-2 inhibitors: a novel strategy in the management of breast cancer. **Drug discovery today**, v. 21, n. 4, p. 598-615, 2016.

RISTIMÄKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; LUNDIN, M.; SALMINEN, T.; HAGLUND, C., et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer research**, v. 62, n. 3, p. 632-635, 2002.

SCHMIDT, B. R.; GLICKMAN, N. W.; DENICOLA, D. B.; GORTARI, A. E. D.; KNAPP, D. W. Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 11, p. 1783-1786, 2001.

SOUZA, C. H. M.; TOLEDO-PIZA, E.; AMORIM, R.; DE NARDI, A. B.; TOBIAS, K. M. Inflammatory mammary carcinoma in 12 dogs: clinical features, cyclooxygenase-2 expression, and response to piroxicam treatment. **Canadian Veterinarian Journal**, v. 50, n. 5, p. 506-510, 2009.

APÊNDICES

Apêndice A. Classificação presente no documento elaborado durante o Encontro de Patologia Mamária: diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias mamárias da cadela realizado em 2013 em Belo Horizonte – MG, promovido pelo Laboratório de Patologia Comparada – ICB/UFMG, com o apoio da Associação Brasileira de Patologia Veterinária e Associação Brasileira de Oncologia Veterinária (CASSALI et al., 2014).

Lesões epiteliais não neoplásicas

Hiperplasia epitelial

Hiperplasia ductal

Hiperplasia lobular

Adenose

Lesões de células colunares

Alteração de células colunares

hiperplasia de células colunares

Lesões de células colunares atípicas

Tumores benignos

Adenoma

Adenomioepitelioma

Adenoma basalóide

Fibroadenoma

Tumor misto benigno

Papiloma ductal

Tumores malignos

Carcinomas

Carcinomas *in situ*

Carcinoma ductal *in situ*

Carcinoma lobular *in situ*

Carcinoma em tumor misto

Carcinoma papilar

Carcinoma Tubular

Carcinoma sólido

Tipos especiais de carcinomas

Carcinoma micropapilar

Carcinoma lobular invasivo

Carcinoma lobular pleomórfico

Carcinoma secretório

Carcinoma mucinoso

Carcinoma rico em lipídeo

Carcinoma de células escamosas

Carcinoma de células fusiformes

Carcinoma anaplásico

Neoplasias mamárias com diferenciação sebácea

Neoplasias mioepiteliais

Adenomioepitelioma maligno

Sarcomas

Fibrossarcoma

Osteossarcoma

Carcinossarcoma

Sarcoma em tumor misto

Outros sarcomas

Condrossarcoma

Lipossarcoma

Hemangiosarcoma

Apêndice B. Sumário de graduação histológica para tumores mamários de acordo com Elston e Ellis (1998) (CASSALI et al., 2014).

Atributo	Escore
Formação tubular	
>75% do tumor	1
10 a 75% do tumor	2
<10% do tumor	3
Pleomorfismo nuclear	
Tamanho nuclear similar a célula normal (2 a 3 vezes o tamanho de uma célula sanguínea vermelha)	1
Moderado aumento de tamanho e variação	2
Variação marcante	3
Contagem mitótica (CGA)*	
0 a 8 contagens mitóticas / CGA	1
9 a 16 contagens mitóticas / CGA	2
17 ou mais contagens mitóticas / CGA	3

*CGA: Campos de grande aumento. Olympus BX-41, lente objetiva de 40X

Apêndice C. Estadiamento clínico (TNM) dos tumores mamários caninos (modificado de Sorenmo et al, 2003) (CASSALI et al., 2014).

Sistema modificado			
T – tumor primário			
T1 <3cm			
T2 3-5cm			
T3 <5cm			
N – linfonodo regional			
N0 histológico ou citológico – sem metástase			
N1 histológico ou citológico – com metástase			
M – metástase a distância			
M0 sem metástases a distância detectadas			
M1 metástases a distância detectadas			
	T	N	M
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T3	N0	M0
Estádio IV	Qualquer T	N1	M0
Estádio V	Qualquer T	Qualquer N	M1