

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

Luiz Henrique de Araújo Machado¹
Flavio Elston²
Lilian Barreto Elston²
Mateus José Sudano³
Carlos Eduardo Fonseca⁴
Fabiola Soares Zahn⁴

RESUMO

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

Palavras-chave: oncologia, mama, cicloxigenase, firocoxibe, cães.

CLINICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EVALUATION OF MAMMARY TUMORS IN FEMALE DOGS UNDERGOING TREATMENT WITH INHIBITORS OF CYCLOOXYGENASE-2 (FIROCOXIB)

ABSTRACT

Breast tumors express the enzyme cyclooxygenase (COX-2), characterizing an inflammatory process or demonstrating the presence of paraneoplastic alterations. This experiment aimed to study the expression of Cox-2 in mammary tumors of dogs and to evaluate the effect of anti-

¹ Departamento de Clínica Veterinária, Clínica Médica de Pequenos Animais/dermatologia, FMVZ-UNESP Campus Botucatu, Correspondência.

² PUC Minas.

³ Doutorado em Medicina Veterinária, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ-UNESP.

⁴ Departamento de Clínica Veterinária, Clínica Médica de Pequenos Animais/dermatologia, FMVZ-UNESP Campus Botucatu.

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

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

EVALUACIÓN CLÍNICA Y INMUNOHISTOQUÍMICA DE LOS TUMORES DE MAMA EN PERRAS EN TRATAMIENTO CON UN INHIBIDOR DE LA CICLOOXIGENASA-2 (FIROCOXIB)

RESUMEN

Los tumores de mama expresan la enzima ciclooxigenasa (COX-2), que caracteriza un intenso proceso inflamatorio y también puede demostrar la presencia de modificaciones paraneoplásico. Este trabajo tiene por objeto estudiar la expresión de COX-2 en tumores mamarios caninos y evaluar el efecto de anti inflamatorios firocoxib acerca del mismo. Los animales fueron divididos en dos grupos: control (9 animales) y tratado (10 animales). Las perras fueron evaluados por examen clínico, bioquímica sérica, volumen, tamaño, ubicación y el estadio clínico por sistema TNM (evaluación de los tumores, ganglios linfáticos y metástasis de los tumores) y evaluación de la calidad de vida. El grupo tratado recibió el firocoxib con dosis de 5 mg/kg por día durante siete días, y después de este período todos los animales fueron re-evaluados y presentados a la mastectomía. Las muestras obtenidas en dos momentos fueron evaluados por histopatología e inmunohistoquímica para la expresión de la COX-2. Los resultados demostraron que, aunque no se observó ninguna diferencia en el tamaño del nódulo más grande o en la expresión de la COX-2 entre los grupos después del tratamiento, el incremento en la expresión de la COX-2 que se observó en el grupo control no se observó en el grupo de tratamiento y que los animales que recibieron el tratamiento durante 7 días, mostró una disminución en los niveles de proteína sérica total ($p=0,00588$) y aumento de los niveles séricos de urea ($p=0,01388$). Estos resultados sugieren que el uso de firocoxibe como coadyuvante en el tratamiento de las perras con cáncer de mama en la mastectomía puede ser beneficiosa para detener la progresión de la enfermedad, a pesar de que se indica que se acompañe los animales para asegurarse de que no hay sangrado gastrointestinal y que la salud es preservada.

Palabras clave: cáncer, mama, ciclooxigenasa, firocoxib, perros.

INTRODUÇÃO

Os tumores de mama são as mais comuns das neoplasias caninas, totalizando cerca da metade dos tumores diagnosticados em cadelas. São raros em animais jovens, acometendo a idade média entre nove e 11 anos (1). Segundo Cassali (2), os tumores mamários espontâneos caninos apresentam muitas semelhanças com os da espécie humana e são passíveis de serem utilizados como modelo experimental para estudos comparativos em humanos. Assim sendo, pode-se inferir que a identificação de ferramentas que venham a auxiliar no prognóstico dos tumores mamários possibilitará a escolha de tratamentos mais adequados para o controle da doença, possivelmente beneficiando a ambas as espécies.

Estudos imunoistoquímicos têm revelado a expressão das enzimas cicloxigenases (Cox) em diversos tecidos. Tais enzimas são responsáveis pela síntese de prostaglandinas, e possuem várias isoformas. A Cox-1 tem sido relatada em quase todos os tecidos de forma fisiológica, enquanto Cox-2 se expressa geralmente induzida por algum processo patológico nos tecidos (3), tais como carcinomas mamários (4, 5), carcinomas intestinais (6) e carcinomas espinocelulares de cães (3).

O primeiro estudo relacionando COX-2 a neoplasias mamárias em cadelas foi realizado por DORÉ et al., (7), que não encontraram expressão desta enzima em mamas normais e observaram sua expressão aumentada nos adenomas e adenocarcinomas mamários. Existe uma correlação entre uma grande expressão de COX-2 com o aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, diminuição da apoptose e formação de novos vasos, indicando um pior prognóstico (6, 8). Outros autores, por sua vez, observaram que mais de 50% dos tumores de glândula mamária apresentaram sobre-expressão de COX-2 e, desta forma, sugeriram que as drogas inibidoras desta enzima possam ser úteis em uma terapia multimodal (9).

Alguns autores mostram que a prostaglandina E_2 (PGE_2), produto catalítico da COX-2, altera os mecanismos da apoptose, diminuindo sua indução nos tecidos (6). Outro estudo demonstrou, por exame imunoistoquímico, que não há expressão de COX-2 em glândulas mamárias sadias, porém há baixa expressão nos adenomas e grande expressão nos adenocarcinomas, o que reforça a possível associação direta entre malignidade do tumor e a expressão de COX-2 (10), embora alguns autores acreditem não haver relação entre a expressão de COX-2 e a evolução tumoral (11).

Alguns trabalhos indicam que a expressão de COX-2 em neoplasias mamárias corresponde a uma menor expectativa de vida, ou seja, um pior prognóstico; e que animais com baixa densidade vascular e com baixa expressão de COX-2 apresentam sobrevivência significativamente mais prolongada (6, 12). Outros autores relatam um decréscimo da expressão das prostaglandinas frente à inibição das COX-2 em estudos *in vitro* em culturas celulares (13).

A partir dessas observações, sugere-se que o tratamento com fármacos inibidores das COX-2 (anti-inflamatórios não esteroidais) possa ser uma boa estratégia para prevenção e tratamento das neoplasias mamárias em cadelas (6, 10, 12).

Os inibidores seletivos de COX-2 (Coxibes) exercem importantes efeitos cardiovasculares adversos, como o aumento de risco de infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca, insuficiência renal e hipertensão arterial. Estes riscos são maiores em pacientes humanos com histórico de doenças correlacionadas (14). Esses fármacos possuem eficácia analgésica e anti-inflamatória, porém com tolerabilidade superior. A inibição específica de COX-2 bloqueia a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI_2 , diminuindo a excreção de sódio, acarretando em edema e elevação da pressão sanguínea. Além disso, a sua inibição altera o equilíbrio entre o tromboxano A_2 (TXA_2), derivado das plaquetas, e a prostaglandina (PGI_2) derivada do endotélio, aumentando o risco

de trombozes e infartos, devendo-se ter uma avaliação criteriosa na escolha da terapia entre os anti-inflamatórios não esteroidais (Aines) e os Coxibes (15).

Um estudo realizado em camundongos transgênicos Her-2/neu com carcinoma ductal *in situ*, não demonstrou prevenção ou controle do crescimento tumoral, bem como de metástases, em animais tratados com Celecoxibe. No entanto, o medicamento teve como efeito a diminuição na expressão do fator de crescimento vascular (VEGF), apontado como principal fator angiogênico das neoplasias mamárias (16).

Em contrapartida, em estudo semelhante realizado por Basu et al. (17) com celecoxibe, também em camundongos transgênicos, observou-se redução significativa no peso do tumor mamário associado à apoptose e diminuição da proliferação celular *in vivo*. A diminuição da proliferação celular está correlacionada com a diminuição da ativação da proteína quinase B/Akt, cujo aumento leva a maior sobrevivência celular, com expressão aumentada da proteína pro-apoptótica Bax e diminuição da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Em um experimento com cães saudáveis, constatou-se que a administração oral de 5,3 mg/kg de firocoxibe não apresentou alterações no hemograma, bioquímica sérica, agregação plaquetária, tempo de coagulação e tampouco promoveu aparecimento de lesões gástricas (avaliação endoscópica) ou sangue oculto fecal, demonstrando ser uma dose sem efeitos colaterais (18).

Entretanto, a administração do mesmo fármaco por noventa dias em cães idosos (idade superior a sete anos) acarretou em alguns efeitos colaterais, tais como: diarreia, vômitos, fezes escuras e anorexia discreta (19).

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

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 19 fêmeas caninas com diagnóstico de neoplasia mamária atendidas no Centro Veterinário do curso de Medicina Veterinária da Universidade PUC Minas *campus* Poços de Caldas. Os animais foram triados pelo atendimento ambulatorial da Universidade durante o período de setembro de 2011 a agosto de 2012 e foram incluídos no trabalho apenas os animais sem doenças concomitantes ou uso prévio recente de medicamentos.

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

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

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

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

Ao final deste período de sete dias (D7), os animais de ambos os grupos retornaram para a realização da cirurgia, colheita de sangue e biopsia excisional. A opção entre mastectomia em bloco ou radical foi feita de acordo com o estadiamento clínico, segundo Owen (20).

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

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

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

As amostras de neoplasias mamárias foram histologicamente classificadas sob microscopia ótica de luz segundo o *Consensus* para Diagnóstico, Prognóstico e Tratamento para Tumores Mamários Caninos (21) e agrupadas para fins estatísticos em: Carcinoma em tumor misto -1; Carcinoma - 2 e Tumor misto benigno - 3.

Os cortes de imunistoquímica foram avaliados sob microscopia ótica de luz e graduados em: sem expressão de COX2 (-), baixa expressão (+), moderada expressão (++) e intensa expressão (+++).

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

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados de idade, número de nódulos e classificação histológica dos tumores das cadelas estudadas no grupo tratado e no grupo controle estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de idade, número de nódulos (NN), classificação citológica do tumor (CCT) e classificação histológica do tumor (CHT) das cadelas avaliadas nos grupos controle e tratado.

Grupo Controle					Grupo Tratado				
Animal	Idade (anos)	Num. Nódulos	CCT	CHT	Animal	Idade (anos)	Núm. Nódulos	CCT	CHT
1t	9	3	1	1	1	9	5	3	1
2t	5	2	3	3	2	9	6	3	1
3t	8	1	1	1	3	5	1	2	2
4t	10	7	2	1	4	10	1	3	3
5t	8	1	1	1	5	11	3	1	1
6t	13	3	2	2	6	4	3	3	1
7t	11	3	3	1	7	9	6	1	1
8t	11	4	3	1	8	7	3	1	1
9t	7	4	3	2	9	12	4	1	1
10t	12	2	1	1	-	-	-	-	-

No presente trabalho, não foram identificados sinais de metástase pulmonar, pelo exame radiográfico, em qualquer dos animais estudados. Por outro lado, nos animais que apresentaram alteração macroscópica dos linfonodos regionais, foram diagnosticadas lesões malignas nas mamas.

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

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

Grupo	VMN (cm)	COX2 (0-3)	UR (mg/dL)	CRE (mg/dL)	AST (UI/L)	ALT (UI/L)	PT (g/dL)								
							D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0	D7	D0
Controle (n=9)	Média	27,54	28,69	0,67a	1,11b	44,22	40,44	0,90	0,95	13,55	13,44	26,44A,a	22,22b	6,87	6,69
	DP	27,53	28,49	0,50	0,78	11,14	4,75	0,245	0,3087	3,71	3,1667	9,66	10,53	1,28	1,51
Tratado (n=10)	Média	12,51	14,00	1,00	0,70	34,6a	46,80b	0,95	1,03	15,5	17,20	16,10B	20,30	6,72a	5,92b
	DP	11,62	14,71	0,67	0,95	14,00	18,28	0,52	0,51	6,43	12,38	7,79	9,52	1,23	1,02

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

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

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

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

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

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

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

O resultado da classificação dos tumores apresentou diferenças entre os dois momentos experimentais, de modo que alguns tumores previamente diagnosticados como benignos, ao primeiro exame por biópsia incisional, tiveram classificação de carcinoma ou tumor misto maligno ao segundo exame por biópsia excisional. Relatos semelhantes foram apresentados em trabalhos que compararam a biópsia aspirativa com agulha fina e a biópsia excisional no momento da mastectomia (22, 23), embora estes autores afirmem ser confiável o diagnóstico inicial como fator prognóstico. Contudo, outros autores afirmam que há grande heterogeneidade no aspecto histológico dos tumores de mama, não sendo confiável o diagnóstico por biópsia por agulha fina (21, 24, 25, 26). O fato de a biópsia incisional não poder ser realizada em camadas mais profundas, além do fragmento ser normalmente pequeno, incorre no risco de se obter uma amostra não representativa do tumor. A diferença entre alguns resultados obtidos entre a primeira e segunda colheita sugere que a biópsia excisional tem maior confiabilidade do que a biópsia incisional e, portanto, que a segunda não deve ser utilizada para estabelecer um prognóstico para o animal. A indicação, portanto, é que se realize o tratamento considerando-se sempre a hipótese do tumor ser maligno (26) e que se estabeleça um diagnóstico definitivo após a mastectomia e avaliação do material obtido neste procedimento (21).

Todos os resultados dos parâmetros laboratoriais obtidos no presente trabalho apresentaram-se dentro da faixa de normalidade para espécie (27), em concordância com os resultados descritos por Steagall et al. (18). Contudo, alguns dos parâmetros bioquímicos sofreram alterações significativas durante o experimento.

A enzima alanina transaminase (ALT), que indica lesão dos hepatócitos (28, 29), diminuiu significativamente nos animais do grupo controle no segundo momento de avaliação ($p=0,33$). Os valores do primeiro momento de avaliação no grupo controle foram também significativamente maiores que aqueles encontrados no grupo tratado neste mesmo momento ($p=0,019$). Possivelmente, este resultado seja devido a alguns animais terem apresentado valor discrepante na primeira colheita, ainda que dentro dos limites de normalidade para a espécie. Como a meia vida desta enzima é de apenas poucas horas após alguma lesão hepática (29), não se pode caracterizar uma continuidade da lesão.

Os níveis séricos de ureia no grupo tratado foram, em média, maiores no segundo momento de avaliação, em contradição aos resultados obtidos num estudo que avaliou cães saudáveis tratados com firocoxibe e tal alteração não foi encontrada (18). Entretanto, um estudo recente (14) relata que os inibidores específicos de COX-2 impedem a produção renal e sistêmica da prostaglandina PGI-2, diminuindo, assim, a excreção de sódio, o que pode levar a uma injúria renal aguda (15). No presente trabalho, entretanto, não foi possível afirmar que o uso do firocoxibe tenha provocado injúria renal aguda, já que os valores de creatinina não se elevaram e os de ureia, ainda que tenham aumentado significativamente após o tratamento, mantiveram-se dentro da normalidade.

Dunn (28) relata a possibilidade do aumento dos níveis séricos de ureia estar associado a perdas de sangue gastrointestinal. Este fato foi confirmado em um trabalho em ratos tratados com diclofenaco por 14 dias (30), mas não foi observado após o uso de meloxicam e firocoxibe por sete dias. Sangramento gastrointestinal não foi observado ou relatado no presente trabalho. Assim, é necessário que o possível efeito do firocoxibe no trato gastrointestinal e na função renal seja mais bem avaliado em experimentos específicos com

maior número de animais e com o uso do medicamento por um período mais longo.

Os níveis de proteína plasmática total diminuíram significativamente entre os dois momentos no grupo tratado ($p=0,006$), embora tenham permanecido dentro dos parâmetros normais. Barbosa et al. (30) não encontraram diferença nos níveis de proteína plasmática em ratos tratados com meloxicam e firocoxibe. No mesmo trabalho, os autores relatam que, com o uso de diclofenaco, ocorreu uma diminuição dos níveis de proteínas séricas, provavelmente devida também a perdas por hemorragias gastrintestinais. Segundo Dunn (28), a diminuição de proteínas séricas por causas não hepáticas podem ocorrer em nefropatias e enteropatias perdedoras de proteínas. Hemorragias digestivas ocorreram em cães com idade superior, quando tratados com firocoxibe por período de 90 dias (19).

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

Embora alguns animais tenham apresentado alterações importantes no tamanho dos tumores, não houve variações significativas no volume do maior nódulo, contrariando a afirmação de alguns autores (6, 8, 10, 11). E, embora não tenham sido verificadas diferenças significativas entre os dois grupos, os valores encontrados no volume do maior nódulo sugerem uma tendência a aumento do volume dos tumores, mesmo nos animais tratados com Firocoxibe, ao contrário do que foi relatado em estudo feito com ratos transgênicos tratados com celecoxibe, que evidenciou uma diminuição no peso médio dos tumores após o tratamento (17).

Um experimento avaliando 30 cadelas com tumores mamários (8) mostrou uma correlação positiva entre a malignidade do tumor e a expressão de COX-2, tanto em tumores mistos malignos como em carcinomas. No presente trabalho, entretanto, essa correlação não foi verificada, em concordância com os resultados apresentados por Costa et al. (11).

O fato de o grupo controle ter apresentado um significativo aumento da expressão da COX-2 após o intervalo de sete dias desde a biópsia incisional, pode indicar uma resposta inflamatória fisiológica normal em decorrência da agressão tecidual, mas pode também significar uma progressão da doença (8). No grupo tratado, entretanto, esse aumento na expressão de COX-2 após a biópsia incisional não foi observado, o que demonstra que houve efeito do firocoxibe, evitando tal aumento no grupo tratado.

Alguns trabalhos sugerem que deva haver uma diminuição da expressão de COX-2 nos animais tratados com anti-inflamatórios (8, 14, 15, 28, 29), associada à diminuição da neovascularização e aumento na apoptose tumoral. Embora a diminuição da expressão de COX-2 no grupo tratado não tenha se confirmado nos animais no presente trabalho, possivelmente em decorrência do pequeno número de animais, o fato de ter havido aumento apenas nos animais do grupo controle pode indicar que o tratamento com firocoxibe possivelmente limite a evolução dos tumores de mama, conforme um relato recente (16).

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

REFERÊNCIAS:

1. Withrow SJ, Vail DM. Tumors of the skin and subcutaneous tissues. In: Withrow and MacEwen's small animal clinical oncology. 4^a ed. Missouri: Saunders; 2007. p.401-75.
 2. Cassali GD. Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela - aspectos comparativos com neoplasias da mama humana [tese]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2000.
 3. Pestili De Almeida E, Piche C, Sirois J, Dore M. Expression of cyclooxygenase-2 in naturally occurring squamous cell carcinomas in dogs. *J Histochem Cytochem.* 2001;49:867-75.
 4. Queiroga FL, Pires I, Lobo L, Lopes CS. The role of Cox-2 expression in the prognosis of dogs with malignant mammary tumours. *Res Vet Sci.* 2010;88:441-5.
 5. De Nardi AB, Daleck CR, Souza CHM, Amorim RL, Rodaski S, Calderon C, et al. Cyclooxygenase -2 expression in mammary tumors in dogs and its correlation to histologic and biologic behavior. *Vet Comp Oncol.* 2005;3:56-7.
 6. Lavallo GE, Bertagnolli AC, Tavares WL, Cassali GD. Cox-2 expression in canine mammary carcinomas: correlation with angiogenesis and overall survival. *Vet Pathol.* 2009;46:1275-80.
 7. Doré M, Lanthier I, Sirois J. Cyclooxygenases-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol.* 2003;40:207-12.
 8. Ribeiro LGR, Damasceno KA, Costa Neto JM, D'Assis MJMH, Costa, AT, Silva NS, et al. Expressão da cox-2 nos carcinomas mamários de cadelas. *Vet Foco.* 2009;6:134-40.
 9. Rassnick KC. How I treat canine mammary gland tumors. In: Proceedings of the North American Veterinary Conference; 2005, Orlando. Orlando: NAVC; 2005. p.666-7.
 10. Half E, Tang XM, Gwyn K, Sahin A, Wathen K, Sinicrope FA. Cyclooxygenase-2 expression in human breast cancers and adjacent ductal carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2002;62:1676-81.
 11. Costa C, Soares R, Reis-Filho JS, Leitão D, Amendoeira I, Schmitt FC. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55:429-34.
 12. Millanta F, Citi S, Della Santa D, Porciani M, Poli A. Cox-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;98:115-20.
 13. Brunelle M, Sartin EA, Wolfe LG, Sirois J, Doré M. Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines. *Vet Pathol.* 2006;43:656-66.
 14. Batiouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-
-
- Machado LHA, Elston F, Elston LB, Sudano MJ, Fonseca CE, Zahn FS. Avaliações clínica e imunoistoquímica de tumores mamários em cadelas submetidas a tratamento com inibidor da Cicloxigenase-2 (Firocoxibe). *Vet. e Zootec.* 2014 dez.; 21(4): 584-594.

- vasculares e renais. *Arq Bras Cardiol.* 2010;94:556-63.
15. Grangeiro NMG, Chaves HVA, Silva AR, Graça JRV, Lima V, Bezerra MM. Enzimas ciclooxigenases 1 e 2: inflamação e gastro-cardio proteção. *Pesqui Med.* 2008;2:13-20.
 16. Tran--Thanh D, Buttars S, Wen Y, Wilson C, Done SJ. Cyclooxygenase-2 inhibition for the prophylaxis and treatment of preinvasive breast cancer in a her-2/neu mouse model. *Cancer Prev Res.* 2010;3:202-11.
 17. Basu GD, Pathangey LB, Tinder TL, Lagioia M, Gendler SJ, Mukherjee P. Cyclooxygenase-2 inhibitor induces apoptosis in breast cancer cells in an in vivo model of spontaneous metastatic breast cancer. *Mol Cancer Res.* 2004;2:632-42.
 18. Steagall PV, Mantovani FB, Ferreira TH, Salcedo ES, Moutinho FQ, Luna SP. Evaluation of the effects of oral firocoxib in healthy dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 2007;30:218-23.
 19. Joubert KE. The effects of firocoxib (Previcox) in geriatric dogs over a period of 90 days. *J S Afr Vet Assoc.* 2009;80:179-84.
 20. Owen L. TNM classification of tumors in domestic animals. Geneva: WHO; 1980.
 21. Cassali GD, Lavallo GE, De Nardi AB, Ferreira E, Bertagnolli AC, Lima AES, et al. Consensus for the diagnosis, prognosis and treatment of canine mammary tumors. *Braz J Vet Pathol.* 2011;4:153-80.
 22. Daleck CR, Franceschini PH, Alessi AC, Santana AE, Martins MIM. Aspectos clínicos e cirúrgicos do tumor mamário canino. *Cienc Rural.* 1998;28:95-100.
 23. Zuccari DAPC, Santana AE, Rocha NS. Correlação entre citologia aspirativa por agulha fina e a histologia no diagnóstico de tumores mamários em cadelas. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2001;38:38-41.
 24. Morrison BM. Canine and feline mammary tumors. In: *Cancer in dogs and cats: medical and surgical management.* 2ª ed. Baltimore: William & Wilkins; 2002. p.565-73.
 25. Nelson RW, Couto CG. Neoplasia mamária: In: *Medicina interna de pequenos animais.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p.686-8.
 26. Waldron DR. Diagnosis and surgical management of mammary neoplasia in dogs and cats. *Vet Med.* 2001;96:943-8.
 27. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5ª ed. London: Academic Press; 1997.
 28. Dunn JK. Doenças do trato alimentar; doenças do sistema urinário. In: *Tratado de medicina de pequenos animais.* São Paulo: Roca; 2001. p.367-443; 607-89.
 29. Andrade SF. Antiinflamatórios. In: *Manual de terapêutica veterinária.* 2ª ed. São Paulo: Roca; 2002. p:89-113.

30. Barbosa CM, Sakate M, Camplesi AC, Vailati F, Moraes LF, Takahira RK. Avaliações hematológicas e bioquímicas do uso de diclofenaco de sódio, meloxicam e firocoxibe em ratos. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2010;47:118-26.

Recebido em: 25/05/2013

Aceito em: 01/11/2014