

# EXPRESSÃO DA COX-2 NOS CARCINOMAS DA MAMA DE CADELAS

RIBEIRO, L.G.R.<sup>1</sup>; DAMASCENO, K.A.<sup>1</sup>; COSTA NETO, J.M.<sup>2</sup>; D'ASSIS, M.J.M.H.<sup>3</sup>; SILVA, N.S.<sup>\*1</sup>; AGUIAR, P.H.P.<sup>2</sup>; CASSALI, G.D.<sup>4</sup>; ESTRELA-LIMA, A.<sup>2</sup>

## Resumo

Na cadela, a freqüência dos tumores mamários espontâneos é duas a três vezes superiores à observada na mulher. A identificação de marcadores tumorais é um método valioso para predizer o comportamento da neoplasia e determinar o prognóstico da doença. Alguns trabalhos relacionam a elevada expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) ao aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, diminuição da taxa apoptótica, e neovascularização, fator que indiscutivelmente ampliam o potencial metastático das células tumorais, representando um prognóstico extremamente desfavorável. Foram selecionadas e acompanhadas 30 cadelas apresentando neoplasia mamária atendidas do HOSPMEV-UFBA no período de agosto/2007 a Junho/2008. Foi realizado o estadiamento clínico, classificação e gradação histológica e imunomarcção para COX-2. A partir do diagnóstico histopatológico, os animais foram divididos em dois grupos: carcinoma evoluindo em tumor misto benigno (CATMB) e outros carcinomas (CA). Foi observada uma freqüência significativamente maior de CATMB. A comparação da imunomarcção ainda que maior no segundo grupo, não apresentou diferença estatisticamente significativa. A COX-2 apresentou correlação significativa e positiva com tamanho tumoral ( $p=0,042$ ) e envolvimento linfonodal ( $p=0,005$ ). A maior taxa de sobrevida global foi observada em cadelas cujos tumores apresentavam menor quantidade de células positivas para COX-2. Com base nos resultados observados podemos concluir que a COX-2 apresenta-se como um marcador potencial para câncer de mama da cadela trazendo perspectivas para desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais.

Palavras-chave: cadela, carcinoma-mamário, COX-2.

## Introdução

Os tumores mamários espontâneos dos caninos apresentam várias características epidemiológicas, clínicas, biológicas e genéticas, semelhantes ao da espécie humana. Assim, as neoplasias mamárias espontâneas da cadela têm sido propostas, em muitos trabalhos, como modelo adequado para estudos comparativos com a espécie humana (CASSALI, 2000). Dados comprovam que dentre as neoplasias, o câncer de mama é o mais freqüente entre as mulheres no Brasil, representando aproximadamente 15% do total de mortes por câncer e em cadelas correspondem a metade do total de tumores diagnosticados, dos quais 50% apresentam caráter maligno (CASSALI, 2000). Na cadela, a freqüência dos tumores mamários espontâneos é duas a três vezes superiores à observada na mulher. São encontrados em animais de meia idade a idosos, sem predisposição

1. Graduanda de Medicina Veterinária EMEV/ UFBA e Bolsista PIBIC.

2. Professor Departamento de Patologia e Clínicas, EMEV-UFBA. [aestrela@ufba.br](mailto:aestrela@ufba.br)

3. Aluno de pós-graduação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos – UFBA)

4. Professor Departamento de Patologia Geral/ Laboratório de Patologia Comparada, ICB-UFMG.

de raça e quando diagnosticada no início, a neoplasia de mama tem elevada chance de cura.

A identificação de marcadores tumorais é um método valioso para prever o comportamento da neoplasia e determinar o prognóstico da doença. A Ciclooxigenase-2 (COX-2) apresenta-se como um marcador potencial para câncer de mama, uma vez que é expressa em resposta a processos inflamatórios, que freqüentemente acompanham as neoplasias e alteram o seu prognóstico. Alguns trabalhos relacionam a elevada expressão da COX-2 ao aumento da capacidade proliferativa das células neoplásicas, diminuição da taxa apoptótica, e neovascularização, fator que indiscutivelmente amplia o potencial metastático das células tumorais, representando um prognóstico extremamente desfavorável. A expressão aumentada e freqüente da COX-2 é relatada nos carcinomas, principalmente de cólon, apresentando correlação com o estadiamento clínico e potencial metastático, características que apóiam o papel da COX-2 na tumorigênese (DORÉ et al., 2003).

Entretanto, o mecanismo de atuação desta enzima na carcinogênese ainda não está completamente elucidado. Neste contexto, caracterizar a expressão da COX-2 nos carcinomas mamários de cadelas bem como verificar a existência de correlação com alguns fatores considerados prognósticos no câncer de mama da cadela é atual, complementar e pertinente. Assim, conhecer a expressão da COX-2 nas neoplasias dos animais domésticos cria perspectivas para o desenvolvimento e utilização, na rotina oncológica dos hospitais veterinários, de drogas como inibidores seletivos da COX-2 (Celecoxib e Firocoxib especialmente se combinada com substâncias inibidoras da aromatase) no tratamento do câncer, a exemplo do que já ocorre na medicina humana. Desta forma, o presente estudo visa analisar e quantificar a expressão da COX-2 nos carcinomas de mama em cadelas e verificar a existência de correlação desta com outros fatores prognósticos e com a taxa global de sobrevida.

### Materiais e Métodos

Foram selecionadas e acompanhadas trinta fêmeas caninas com diagnóstico de neoplasia mamária atendidas no Hospital Veterinário da UFBA (Bahia-Brasil) no período de agosto/07 a junho/08. Todos os animais foram submetidos ao exame clínico detalhado e realização de raio-x simples de tórax para pesquisa de metástase pulmonar. Nenhum dos animais estudados fez uso prévio de drogas anti-neoplásicas, antiinflamatórias e antibióticos, sendo esse aspecto um critério de exclusão. Foi realizado acompanhamento trimestral dos animais para determinação da taxa de sobrevida livre da doença até um ano após a cirurgia. Foi realizada a necropsia dos animais que vieram a óbito, quando autorizadas pelos proprietários. O estadiamento clínico utilizado foi o sistema TNM (tumor/linfonodo/metástase). Esta classificação baseia-se no tamanho do tumor primário (T), envolvimento neoplásico de linfonodos regionais (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M).

Para a análise histopatológica, os fragmentos da (s) mama (s) afetada (s) (incluindo pele e tecido subcutâneo) e linfonodos regionais foram imediatamente coletados após a cirurgia e fixados em formol neutro e tamponado com fosfato a 10% e processados pela técnica rotineira de inclusão em parafina, coradas pelas

técnicas da Hematoxilina-Eosina e posteriormente classificadas, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) para tumores e displasias da glândula mamária de cães e gatos (MISDORP et al., 1999).

Os microarranjos de tecido (TMA) foram construídos utilizando blocos representativos de carcinoma mamário. As áreas de interesse previamente marcadas na lâmina e identificadas nos blocos doadores foram retiradas e transferidas para os blocos receptores. Para cada caso, foram retirados dois cilindros de 2,0 mm (core) de duas áreas distintas do tumor.

O anticorpo anti-COX-2 foi utilizado em seções histológicas de blocos TMA. Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase (Ultra vision large volume detection system anti-polyvalent, HRP – ready to use – Lab Vision) com recuperação antigênica por calor úmido (solução recuperadora antigênica - Dako). A imunomarcagem da COX-2 foi analisada quanto a sua distribuição percentual, com escore variando de 0 a 4 (0 = 0%, 1 = < 10%, 2 = 10 - 30%, 3 = 31 - 60% e 4 = > 60%) e intensidade (baixa (+), moderada (++) e intensa (+++)(escore variando de 0 a 3). O escore total foi obtido pelo produto da distribuição pela intensidade, segundo Heller et al., 2005. Foram analisados 10 campos lâmina/tumor. Para a quantificação foi realizada a captura de imagens (câmera digital adaptada a um microscópio Olympus BX-40). A contagem das células consideradas COX-2 positivas, positividade citoplasmática, foi realizada com base na análise destas imagens (software Corel Draw versão 7.468).

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software SPSS versão 13.0. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste Student-Newman-Kewls (SNK) e correlação de Pearson. Para avaliação do tempo de sobrevivência livre da doença foi utilizada a análise da Kaplan Meyer. Pelo teste log-rank os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ . Os animais cujo contato foi perdido foram considerados censurados.

## Resultados e Discussão

A idade das cadelas estudadas variou entre seis e 14 anos, sendo 10,2 anos a média de acometimento, semelhante ao que ocorre em outros trabalhos, onde se observa uma maior frequência de neoplasias mamárias entre nove e 11 anos de idade, com baixa incidência em animais menores que dois anos (MEUTEN, 2002). Constatou-se, ainda, um maior envolvimento de cães da raça poodle (12/40%), seguida por cães sem raça definida (8/26,7%). Entretanto, com base no tamanho amostral, não foi possível afirmar a existência de predisposição desta raça. A maioria das cadelas apresentou acometimento bilateral da cadeia mamária (23/76,6%), sendo o número de mamas acometidas superior a cinco (12/40%), localizadas com maior frequência nas mamas abdominal caudal (30/24,6%) e inguinal (41/33,6%). Meuten (2002) afirma que estas mamas são mais acometidas, devido a maior quantidade de parênquima mamário, sofrendo assim maior alteração proliferativa em resposta aos hormônios.

Na avaliação do estadiamento clínico, foram observadas as frequências de 30% (9), 30%(9), 23,3%(7) 3,3%(1) 13,3%(4) para os estádios I, II, III, IV e V respectivamente. Para a análise do tamanho tumoral, foram avaliados apenas os

tumores obtidos de cadelas linfonodo-negativas (N0) e livres de metástase à distância (M0), correspondente a 24 casos, classificados como T1 (9/30%), T2 (9/37,5%) e T3 (6/ 25%). A existência de imagem radiográfica compatível com metástase pulmonar foi observada em 13,3% (4) dos casos.

Todas as fêmeas com estadiamento V, ou seja, com presença de metástase à distância, vieram a óbito antes dos 100 dias de acompanhamento, enquanto 80% das cadelas em estágio I e 60% das cadelas que apresentaram apenas alterações circulatórias nos linfonodos regionais sobreviveram ao tempo máximo de acompanhamento (309 dias). Esses resultados refletem a significativa correlação existente entre a taxa de sobrevida, envolvimento linfático e presença de metástase à distância, dois fatores utilizados na determinação do grau de estadiamento.

A partir do diagnóstico histopatológico, os tumores foram divididos em dois grupos: grupo 1 - carcinoma evoluindo em tumor misto benigno (CATMB) e grupo 2 - outros carcinomas (CA), sendo o último grupo constituído pelos subtipos tubular, papilar e sólido. Foi observada uma incidência significativamente maior de CATMB (22/73,3%). Esses tumores consistem na transformação maligna do componente epitelial dos tumores mistos benignos. Desta forma, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre os grupos CATMB e CA, a média de sobrevida livre da doença foi superior no primeiro grupo indicando um melhor prognóstico. Na avaliação do grau histológico foram obtidos 23 casos (76,7%) grau I, destes reforçando um melhor prognóstico para as cadelas com CTMB. O exame microscópico dos linfonodos revelou que quatro casos (13,3%) corresponderam a hiperplasia reacional; cinco casos (16,7%) a alterações circulatórias; 15 casos (50%) apresentaram hiperplasia associado à alterações inflamatórias; 5 casos (16,7%) metástase de carcinoma mamário, e apenas 1 caso (3,3%) não apresentou nenhuma alteração significativa.

O tempo máximo de sobrevida de 309 dias foi alcançado por 15 animais, o mínimo, zero dia, referente à cadela que veio a óbito logo após a cirurgia, sendo a média de 197,83 dias. O grupo CATMB embora tenha apresentado uma média de sobrevida global ( $202,95 \pm 120,29$ ) superior ao grupo dos CA ( $183,75 \pm 134,87$ ), não foi observada diferença significativa entre os grupos. Os episódios de metástase à distância corresponderam a (4/13,3%) e todos eles vieram a óbito; recidiva local representou (7/23,3%) e em apenas dois casos, houve perda de contato com os proprietários, sendo estes animais considerados censurados. Os três animais submetidos à necropsia apresentaram como *causa mortis* insuficiência respiratória aguda em consequência da metástase pulmonar de tumor mamário resultando em hemotórax. A sobrevida apresentou relação com envolvimento linfático ( $p=0,030$ ), estágio ( $p=0,008$ ) e metástase ( $p=0,003$ ).

Todas as amostras analisadas foram positivas para a COX-2, apresentando intensidade e distribuição variadas, sendo predominante uma distribuição difusa (17/56,7%) de intensidade moderada (13/43,3%). A atuação da COX-2 na progressão tumoral ainda requer inúmeras pesquisas. Entretanto, pode ser visualizado com base na curva de sobrevida, embora não significativa, a existência de uma relação proporcionalmente inversa, ou seja, quanto maior a expressão da COX-2 menor é a taxa de sobrevida, corroborando com dados da literatura.

Alguns estudos já verificaram maior expressão da COX-2 nos tumores mamários malignos de cadelas em relação aos benignos (DORÉ et al., 2003; HELLER et al., 2005) e atribuem um escore que varia de 1 a 12, obtido a partir do produto da intensidade pela distribuição da COX-2. Desta forma um elevado escore retrata um tipo histológico mais agressivo, conseqüentemente em um pior prognóstico. No presente estudo foi verificado maior freqüência do escore oito (8/26,6%), considerado intermediário, entretanto, em sua maioria os escores mais elevados corresponderam aos carcinomas de pior prognóstico. A comparação da imunomarcagem entre os grupos dos CATMB (2855 ±1264) e CA (3333 ± 1965), ainda que maior no segundo grupo, não apresentou diferença estatisticamente significativa, não sendo observada correlação da COX-2 com o tipo histológico. Estes resultados provavelmente resultaram da falta de homogeneidade da amostra, constituída basicamente por carcinomas evoluindo em tumores mistos benignos.

A COX-2 apresentou correlação significativa e positiva com tamanho tumoral ( $p=0,042$ ) e envolvimento linfonodal ( $p=0,005$ ). Dos cinco animais diagnosticados com metástase para linfonodo, três apresentaram contagem de COX-2 acima do valor da média total dos casos e dois apresentaram recorrência local (3/60%). Segundo Grudzinsk et al (2006), a expressão elevada da COX-2 é um fator de pior prognóstico, principalmente na presença de metástase linfática, devido a correlação desta enzima com a angiogênese e recidiva local. A expressão elevada da COX-2 é correlacionada com vários parâmetros de malignidade para tumor de mama, dentre eles estão o tamanho do tumor, presença de recidiva e grau histológico (RISTIMÄKI et al, 2002). Neste estudo, dos 11 animais com tamanho tumoral superior a cinco centímetros oito apresentaram contagem de COX-2 superior a média e quatro deles também apresentavam metástase à distância. Estes dados estão refletidos na curva de sobrevida, onde 80% dos animais que apresentavam contagem de COX-2 no intervalo 1, ou seja, até 1500 células imunomarcadas apresentaram maior taxa de sobrevida global .

### Conclusão

Com base nos resultados observados podemos concluir que a COX-2 apresenta-se como um potencial e importante fator prognóstico, tendo em vista sua maior concentração em tumores de pior evolução e sua correlação inversa com a taxa de sobrevida global. Desta forma, verificar expressão desta enzima e correlacioná-la aos fatores prognóstico traz perspectivas para desenvolvimento de novas terapias anti-tumorais.

### Referências

CASSALI, G. D. Estudo morfológico, imuno-histoquímico e citométrico de tumores mamários da cadela – aspectos comparativos com as neoplasias da mama humana. Belo Horizonte: Univ. Fed. de Minas Gerais, p. 72, **Tese de Doutorado**, 2000.

CAVALCANTI, M. F. Fatores prognósticos na abordagem clínica e histopatológica dos carcinomas mamários de cadelas: estadiamento TNM e sistema de nottingham. Belo Horizonte: UFMG, **Dissertação de Mestrado**, p.106, 2006.

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

GRUDZINSKI, M.; CAMBRUZZI, E.; LAHUDE, E.; et al. Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. **Vet. Ass. Med. Bras.**, p. 275-280, 2006.

HELLER, D.A.; CLIFFORD, C.A.; GOLDSCHMIDT, M.H.; et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. **Vet Pathol**, v.42, p.776-780, 2005.

MENDELSON, C. R.; HARDY, D. B.. Role of the progesterone receptor (PR) in the regulation of inflammatory response pathways and aromatase in the breast. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology** SBMB-2660, 2006.

MEUTEN, D.J. **Tumors in domestic animals**. 4.ed. Iowa State: Univ. California, p 788. 2002.

MISDORP, W.; ELSE, R.W.; HELLMÉN, E. et al. Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2nd Series. v. VII. Washington DC, **Arm. Forc. Inst. Pathol**. American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. p. 1-59, 1999.

RISTIMÄKI, A.; SIVULA, A.; LUNDIN, J.; et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. **Cancer Res**. v. 62, p. 632 -635, 2002.