



EXPRESSÃO DA COX-2 EM MASTOCITOMAS CANINOS

Jane Regina França César¹, Carlos Roberto Daleck², Mirela Tinucci Costa², Luis Gustavo Gosuen Gonçalves Dias³, Sabryna Gouveia Calazans³

1. Mestre, Professora da Faculdade Anhanguera, Campinas, São Paulo, Brasil
2. Professor (a) Doutor (a) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil
3. Professor (a) Doutor (a) da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca, São Paulo, Brasil
e-mail: (sgcalazans@gmail.com)

Recebido em: 06/10/2012 – Aprovado em: 15/11/2012 – Publicado em: 30/11/2012

RESUMO

O mastocitoma é uma das neoplasias mais comuns no cão. A cicloxigenase-2 (COX-2) tem sido associada com a progressão tumoral e amplamente investigada em diferentes tipos de tumores. Este estudo avaliou a expressão da COX-2 por imunohistoquímica em 24 amostras de mastocitomas caninos, distribuídos em três grupos de acordo com seus graus histológicos. A média de expressão da COX-2 foi de 55,4% no grupo dos mastocitomas de grau I (G1)(n=8), 64,6% no de grau II (G2)(n=8) e 71,7% no de grau III (G3)(n=8). O grupo controle (GC)(n=5) apresentou média de marcação de 0,43%. Houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre GC e G1, GC e G2, GC e G3, bem como entre G1 e G3. Considerando o anticorpo e a classificação histológica empregados, conclui-se que a expressão da COX-2 por imunohistoquímica é inversamente proporcional ao grau histológico do tumor em mastocitomas caninos.

PALAVRAS- CHAVE: cão, cicloxigenase-2, neoplasia

EXPRESSION OF COX-2 IN CANINE MAST CELL TUMORS

ABSTRACT

Mast cell tumor is one of the most common malignancies in dogs. Cyclooxygenase-2 (COX-2) has been associated with tumor progression and widely investigated in different types of tumors. This study evaluated the expression of COX-2 by immunohistochemistry in 24 samples of canine mast cell tumors, considering their histological grades. The expression mean of COX-2 was 55.4% in the group of mast cell tumor grade I (G1) (n = 8), 64.6% in grade II (G2) (n = 8) and 71.7% in grade III (G3) (n = 8). The expression mean of COX-2 in control group (CG) (n = 5) was 55.4%. There was a statistical difference ($P < 0.05$) between GC and G1, G2 and GC, GC and G3 and between G1 and G3. In conclusion, considering the antibody and histological classification employed, the expression of COX-2 by immunohistochemistry is inversely proportional to the histological grade of the tumor in canine mast cell tumors.

KEYWORDS: dog, cyclooxygenase-2, neoplasia

INTRODUÇÃO

O mastocitoma é uma neoplasia maligna constituída por mastócitos, que são células complexas, multifuncionais e tem papel central na imunidade funcional e adquirida (KIRSHENBAUM, 2000). A etiologia dos mastocitomas não está comprovadamente definida, mas sugerem-se várias hipóteses, como inflamação crônica, aplicação de substâncias irritantes na pele, infecção viral, alterações genéticas, mas a razão de sua elevada incidência é desconhecida (DALECK et al., 2009). Todavia, é comprovado o envolvimento do receptor de tirosina-quinase c-KIT na patogenia desta neoplasia (ZEMKE et al., 2001).

Mesmo com o diagnóstico de mastocitoma firmado pela CAAF, faz-se necessária a avaliação histológica, uma vez que o comportamento e prognóstico do tumor estão diretamente relacionados a gradação histológica (LONDON & SEGUIN, 2003). Patnaik et al. (1984) criaram um esquema de classificação, considerando três categorias (sendo 1, bem diferenciado; 2, moderadamente diferenciado e 3, pouco diferenciado), e que ainda hoje é o mais utilizado pelos patologistas. A ressecção cirúrgica, sempre que possível, é a modalidade de tratamento mais efetiva, quando realizada com margens de segurança (FULSCHER et al., 2006). A cirurgia pode ser curativa, sobretudo nos casos de tumores bem diferenciados, mas mastocitomas de grau II ou III podem exigir o tratamento medicamentoso, como a quimioterapia antineoplásica (LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007; WELLE et al., 2008).

A teoria de que fármacos anti-inflamatórios podem afetar a carcinogênese iniciou a relação entre a inflamação crônica e o câncer (SWIERGIEL & DUNN, 2002). A inflamação crônica tem sido correlacionada ao desenvolvimento de várias neoplasias humanas (COUSSENS & WERB, 2001). Estudos sugerem que 15% dos tumores malignos provêm de lesão inflamatória prévia (O'BYRNE & DALGLEISH, 2001). Citocinas inflamatórias podem induzir a liberação de vários fatores regulatórios que influenciam a sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, além de induzirem a ciclooxigenase-2 (COUSSENS & WERB, 2001), uma enzima induzida e expressada por células envolvidas na inflamação e outras condições patológicas como artrites, doença de Alzheimer e câncer (HALLIDAY et al., 2000).

De acordo com Eberhart et al. (1994), a COX-2 está associada ao crescimento celular e ação de oncogenes. Esses autores demonstraram a presença de COX-2 no tecido neoplásico (câncer de cólon) e sua ausência em tecido normal (intestino). A alta expressão de COX-2 nas neoplasias tem sido associada a mecanismos de promoção tumoral, devido a indução da angiogênese, inibição da apoptose, aumento da capacidade de invasão e metástase, modulação da inflamação e da resposta imune (TSUJII et al., 1998; CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004) (Figura 1).

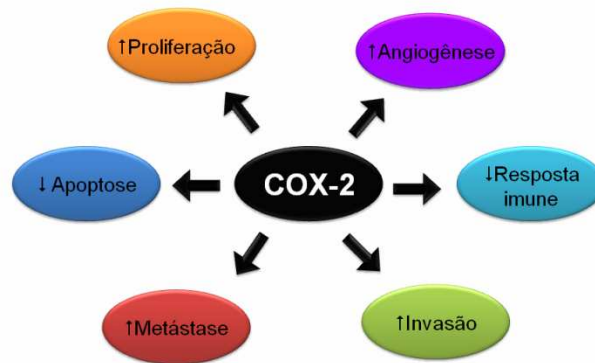


Figura 1. Vias influenciadas pelo aumento da expressão da COX-2 em neoplasias.

Em cães, além do uso convencional como anti-inflamatório, analgésico e antitérmico (GAYNOR, 2008; LOONEY, 2010) os inibidores de COX-2 são uma opção de tratamento para diferentes tumores em cães, particularmente os que apresentam aumento da expressão desta enzima, como carcinoma de células escamosas (PESTILI DE ALMEIDA et al., 2001), carcinoma de células transicionais (KHAN et al., 2000) e alguns tipos de tumores de mama (DE NARDI et al., 2005; MILLANTA et al., 2006). Nas neoplasias mamárias de cadelas, a expressão da cicloxigenase-2 variou de acordo com a classificação histológica tumoral, observando-se baixa expressão nas células dos adenomas e alta nos carcinomas e carcinomas metastáticos (DE NARDI et al., 2005).

Estudos que avaliaram a COX-2 em mastocitomas caninos são raros e contraditórios. Heller et al. (2005) avaliaram 17 mastocitomas de grau 2 e obtiveram apenas uma amostra positiva para o anticorpo utilizado. Contudo, recentemente, Vascellari et al. (2012) avaliaram 53 amostras e obtiveram positividade em 78% dos tumores. Este mesmo estudo não encontrou relação entre a positividade da COX-2 com o grau histológico. Prada et al. (2011) avaliaram, além da porcentagem de células positivas, a intensidade da marcação. Oitenta e seis por cento dos tumores foram positivos para COX-2, embora somente a intensidade de marcação tenha se relacionado com o grau histológico do mastocitoma.

Este trabalho teve por objetivo avaliar a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2) em mastocitomas caninos de diferentes graus histológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo, foram selecionados 24 casos de mastocitoma canino, de diferentes raças, peso e idade, entre machos e fêmeas, atendidos no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) – Câmpus de Jaboticabal, nos anos de 2001 a 2005. Nenhum dos cães selecionados para este experimento tinha histórico de tratamento com anti-inflamatórios previamente ao diagnóstico e coleta de material para que não houvesse interferência com os resultados do estudo imuno-histoquímico.

Em todos os casos, após o procedimento cirúrgico, foi realizada a coleta da amostra contendo tecido neoplásico. Os espécimes tumorais e de tecido cutâneo e subcutâneo sem alterações foram fixados em solução de formaldeído 10%, tamponados com fosfato, pH 7,2. Após um período de fixação de aproximadamente 18 horas, o material foi transferido para álcool 70%, seguindo-se procedimentos usuais para inclusão em parafina. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos por um micrótomo automático (Leica . RM 2155), corados pela técnica de hematoxilina e eosina (H.E.) e azul de toluidina (A.T.). Para a avaliação histopatológica, as amostras foram analisadas por microscópio triocular Eclipse E200 (Nikon), o que permitiu confirmar o diagnóstico e classificar os tumores, seguindo os critérios de Patnaik et al. (1984). Após a coloração em H.E. e A.T., os cortes foram avaliados por patologista e separados em grupos experimentais, sendo G1 (n= 8), constituídos por mastocitoma grau I, G2 (n = 8), por mastocitoma grau II e G3 (n = 8), por mastocitoma grau III. Amostras de tecido cutâneo e subcutâneo, de locais aleatórios, sem alterações patológicas macroscópicas foram coletadas de cinco cães hígidos, constituindo o grupo controle (GC).

A técnica de imuno-histoquímica utilizada foi o complexo avidina-biotina (ABC), desenvolvido por Hsu et al. (1981). Cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas pré-tratadas com Poly-L-Lysina (Sigma 8920) com o objetivo de promover maior aderência dos cortes nas lâminas, evitando a perda de material durante o processamento.

O bloqueio da atividade da peroxidase endógena foi realizado por meio de imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 10% e metanol, por 30 minutos. Em seguida, foi utilizada a recuperação antigênica gerada pelo aquecimento em banho-maria por 50 minutos a 95°C. Neste processo, os cortes foram imersos em solução diluída de recuperação antigênica (Target Retrieval Solution 10X concentrante – Dakocytomation, n°S1699) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o resfriamento das lâminas, estas foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum free, Dakocytomation, n°X0909). Os cortes foram incubados com o anticorpo primário CX-294 (Dakocytomation), na diluição de 1:50, a 4°C durante toda a noite, de acordo com as determinações específicas. Após essa etapa, foi utilizado o kit baseado na técnica da avidina-biotina-peroxidase (LSAB+ System – Dakocytomation, n°K690). A observação da reação foi obtida empregando-se o cromógeno à base de diaminobenzidina (DAB) (liquid DAB substrate-chromogen system – Dakocytomation, n° K34 68), incubado por 5 a 8 minutos. Os cortes foram então contracordados com hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os anticorpos primários anti-COX-2 (clone CX-294, Dakocytomation) foram substituídos por solução tampão PBS (0,01M e pH7,2). Como controle positivo, foram utilizados cortes de carcinoma mamário canino.

A observação da frequência das marcações foi realizada por dois observadores em microscópio de luz triocular modelo Eclipse E200 (Nikon) e foram aleatoriamente selecionados. Cinco campos por corte e, em cada campo, foram contados um total de 100 células neoplásicas, entre marcadas e não marcadas. Foi utilizada uma ocular com graticula integrada Nikon (Nikon, Inc. – Japan), com aumento de 400X, sendo a ocular de 10X e objetiva de 40X. Destes, foram extraídas médias em porcentagem de células neoplásicas marcadas em relação ao total. A análise estatística empregada para comparar as médias e desvio-padrão das porcentagens de marcação entre os grupos foi a de Tukey-Kramer, considerando-se como valores significantes $p < 0,05\%$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação às raças, verificou-se maior frequência em cães sem raça definida (37,5%), seguidas por aqueles da raça Boxer (25%), Dachshund (12,5%) e Poodle (8,3%). Outras raças apresentaram pouca representatividade (Figura 2). A média de idade dos 24 animais portadores de mastocitoma foi de 8,5 anos, sendo que 20,83% tinham entre 1 e 5 anos de idade; 50%, entre 6 e 10 anos e 20,7%, com idade acima de 10 anos. Com relação ao sexo, houve número superior de machos (n=14) em relação às fêmeas (n=10).

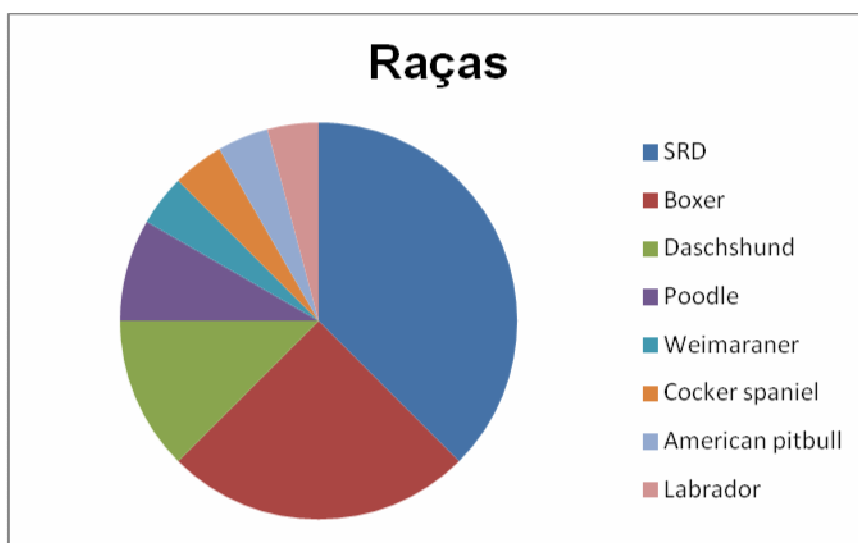


Gráfico 1. Frequência dos mastocitomas distribuídos conforme a raça dos cães selecionados para este estudo.

O exame histopatológico é o método de eleição para se identificar as características de uma neoplasia (MOTA & OLIVEIRA, 1999). Observou-se baixa reatividade para a COX-2 no grupo controle (0,43%), contrapondo o resultado encontrado nos espécimes tumorais, onde a expressão de COX-2 mostrou aumento na expressão do marcador, conforme a graduação de malignidade do tumor (G3>G2>G1). A expressão da COX-2 no grupo dos mastocitomas de grau I foi de 55,4%, ao passo que nos de grau II, a expressão foi de 64,6%. Para os mastocitomas de grau III, verificou-se a maior expressão, em que 71,7% das células apresentaram reatividade. Quando se comparou o número de células imunomarcadas entre os grupos experimentais, houve significância ($P < 0,05$) entre o grupo controle (GC) e mastocitoma grau I (G1), grupo controle (GC) e mastocitoma grau II (G2), grupo controle (GC) e mastocitoma grau III (G3). Também observamos diferença entre G1 e G3 ($P < 0,05$) (Tabela 1) (Figura 3).

Tabela 1. Média e desvio-padrão da porcentagem de marcação para COX-2

Grupo	Marcação da COX-2 (%)
GC	0,43 ± 0,3 ^a
G1	55,4 ± 10,7 ^b
G2	64,6 ± 14,2 ^{bc}
G3	71,7 ± 3,8 ^c

Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey-Kramer a 5%

A imuno-histoquímica é um método auxiliar de diagnóstico que está sendo cada vez mais utilizada na rotina (BARRA, 2006). Entretanto, fatores como a presença de ligações cruzadas dos anticorpos com outros epítomos (LIU et al., 1997) e o método de quantificação das células marcadas podem interferir com a sensibilidade e especificidade da técnica (BERGMAN et al., 1996; BARRA, 2006). Com base nesses relatos, no presente trabalho, foram adotados alguns critérios com o intuito de minimizar possíveis fatores intercorrentes, como a utilização de anticorpos monoclonais e a contagem das células neoplásicas marcadas em cinco campos aleatórios por corte e a leitura ser realizada por dois observadores. Além destes cuidados mencionados, também foram utilizados rígidos controles positivos e negativos, métodos de recuperação antigênica e bloqueio de reações inespecíficas visando a obtenção de reações fidedignas.

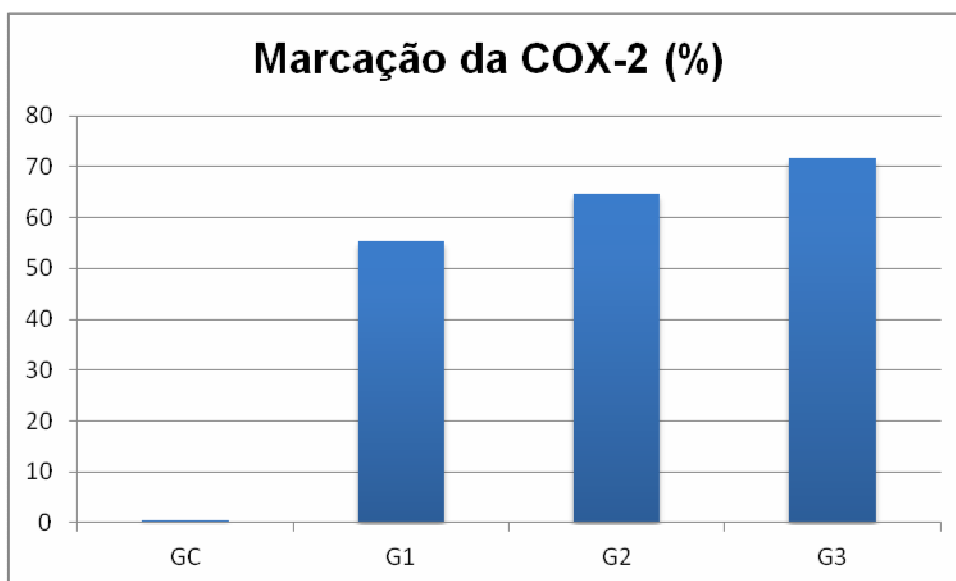


Gráfico 2. Porcentagem de marcação da cicloxigenase-2 nos mastocitomas dos grupos G0 (controle), G1 (mastocitoma grau 1), G2 (mastocitoma grau 2), e G3 (mastocitoma grau 3). Observar expressão quase nula em G0.

A contagem das células imunorreativas foi realizada independente da intensidade da coloração de marcação, pois, de acordo com Garcia et al. (1989) e Scott et al. (1991) a distinção entre células fortemente positivas e fracamente positivas durante a contagem pode ser subjetiva e induzir a erros na avaliação. Neste estudo, foi observada baixa expressão de COX-2 em tecido cutâneo canino sem alterações patológicas (0,43%). Este achado era esperado, pois esta enzima, diferentemente da COX-1, é indetectável na maioria dos tecidos, sendo expressa apenas em resposta a certos estímulos como a presença de citocinas, fatores de crescimento, endotoxinas bacterianas e oncogenes (BURLEIGH, 2002; KRAUS, 2003). Margulis et al.(2007) obtiveram resultados semelhantes, pois relataram que a imunomarcção de COX-2 foi praticamente nula em tecido normal de bexiga em humanos.

A imunorreatividade da COX-2 nos espécimes tumorais foi crescente de acordo com o grau de malignidade dos mastocitomas, corroborando com os achados de diversos autores em diferentes neoplasias tanto em humanos como em

animais, que propõem que esta enzima seja responsável pelo desenvolvimento e progressão tumoral (TSUJII et al., 1998; CAO & PRESCOTT, 2002; DORÉ et al., 2003; HELLER et al., 2005; SHEEHAN et al., 2005; DE NARDI et al., 2005; MIYASHITA et al., 2006; TAKATORI et al., 2007). Esses dados contradizem em parte, os resultados estabelecidos por Klimp et al. (2001) e Cervello et al. (2005) que observaram imunorreatividade de COX-2 em neoplasias ovarianas e carcinomas hepatocelulares, respectivamente, porém não evidenciaram correlação entre a imunomarcagem e a graduação histológica.

Nós podemos observar pelos resultados obtidos neste estudo que as neoplasias mais agressivas apresentaram maior expressão de COX-2, porém mesmo nos mastocitomas classificados como grau I, onde houve menor expressão de COX-2, esta neoplasia apresentou elevada imunomarcagem, com valores superiores a 55% (Figura 3). Esses resultados são contraditórios aos de recentes estudos publicados nos últimos anos, como o de Prada et al. (2011) e Vascellari et al. (2012), que não encontraram associação entre a porcentagem de marcação e a graduação histológica dos mastocitomas. É importante enfatizar que os estudos em questão utilizaram diferentes clones da enzima. Entretanto, foi consensual o elevado número de amostras positivas, acima de 70%.

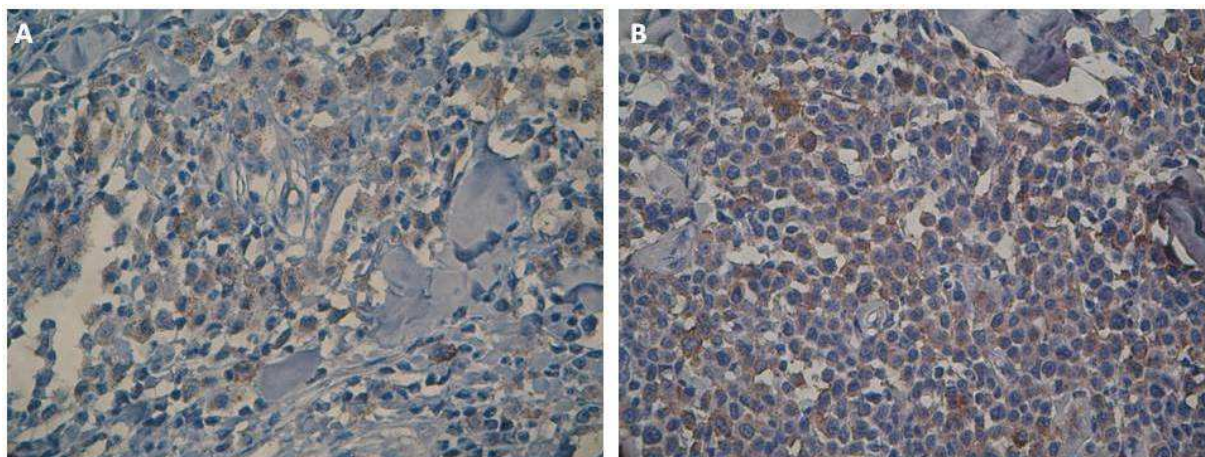


Figura 2. Fotomicrografias de mastocitomas caninos, submetidos à reação de imuno-histoquímica pelo método ABC, utilizando o anticorpo anti-COX-2, clone CX 294. Aumento de 20X. Observa-se baixa porcentagem de marcação citoplasmática em mastocitoma de grau I (A) e alta de porcentagem de marcação citoplasmática em mastocitoma de grau III (B). A marcação é evidenciada pela coloração acastanhada no citoplasma das células. Contracoloração: Hematoxilina de Harris.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que a expressão da COX-2 por imuno-histoquímica é diretamente proporcional ao grau histológico do tumor em mastocitomas caninos, considerando o anticorpo e a classificação histológica empregados. A alta expressão de COX-2 encontrada nos mastocitomas, mesmo nos tumores de menor grau de diferenciação, encorajam os médicos veterinários a empregarem terapias anti-COX-2 nos mastocitomas caninos.

REFERÊNCIAS

BARRA, M. B. O uso da imunohistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. *Revista da AMRIGS*, v.50, n.2, p.173-184, 2006.

BERGMAN, P. J.; OGILVIE, G. K.; POWERS, B. E. Monoclonal antibody C219 immunohistochemical against p-glycoprotein: sequential analysis and predictive ability in dog with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.10, n.6, p. 354-359, 1996.

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

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

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **Journal Experimental Medicine**, v. 193, p. 23-26, 2001.

DALECK, C. R.; ROCHA, N. S.; FURLANI, J. M.; CESAR, J. R. F. Mastocitoma. In: DALECK, C. R.; NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2009 p. 282-291.

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

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

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

FULSCHER, R. P.; LUDWIG, L. L.; BERGMAN, P. J.; NEWMAN, S. J.; SIMPSON, A. M.; PATNAIK, A. K. Evaluation of a two-centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.228, p.210-215, 2006.

GARCIA, R. L.; COLTRERA, M. D.; GROWN, A. M. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparasion with flow cytometric analysis. **The American Journal of Pathology**, v.134, p. 733-739, 1989.

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

LOONEY, A. Oncology pain in veterinary patients. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 25, n. 1, 2010.

HALLIDAY, G.; ROBINSON, S. R.; SHEPHERD, C.; KRILL, J. Alzheimer's disease and inflammation: a review of cellular and therapeutic mechanisms. **Clinical Experience Pharmacology**, v. 27, p.1-8, 2000.

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

HSU, S. M.; RAINER, L.; FANGER, H. A. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **American Journal of Clinical Pathology**, v.75, p.734-738, 1981.

KIRSHENBAUM, A. Regulation of mast cell number and function. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 14, p.497-516, 2000.

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

KRAUS, V. B. Cyclooxygenase-2 inhibitors and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the management of arthritis. **Foot and Ankle Clinics**, v.8, p. 187-2000, 2003.

LIU, B.; SUN, D.; XIA, W.; HUNG, M. C.; YU, D. Cross-reactivity of C219 anti-p170 (mdr-1) antibody with p185 (c-erbB2) in breast cancer cells: cautions on evaluating p170 (mdr-1). **Journal of the National Cancer Institute**, v.89, n.20, p.1524-1529, 1997.

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

MILLANTA, F. ; CITI, S. ; DELLA SANTA, D. ; PORCIANI, M. ; POLI, A. COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.

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

MOTA, E.F.F.; OLIVEIRA, S.R. Diagnóstico citológico em medicina veterinária. **Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG**, n.30, v.1, p.29-47, 1999.

MULLINS, M.N.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J.; EHRHART, E.J.; THAMM, D.H.; LANA, S.E. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998–2004). **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 228, p. 91-95, 2006.

O'BYRNE, K.J.; DALGLEISH, A.G. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 473-483, 2001.

LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p. 473-489, 2003.

PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. **Veterinary Pathology**, v.21, p.469-474, 1984.

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

SCOTT, R.J.; HALL, P. A.; HALDANE, J. S.; VAN NOORDEN, S.; PRICE, Y.; LANE, D. P.; WRIGHT, N. A. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **Journal of Pathology**, v.165, p.173-178, 1991.

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

SWIERGIEL, A.H. & DUNN, A.J. Distinct Roles for Cyclooxygenases 1 and 2 Interleukin-1-Induced Behavioral Changes. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.302, p.1031-6, 2002.

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

TSUJII, M.; KAWANO, S; TSUJI, S.; SAWAOKA, H.; HORI, M.; DUBOIS, R. N. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. **Cell**, Cambridge, v. 93, p. 705-16, 1998.

THAMM, D. H.; VAIL, D. M. Mast cell tumors In: WITHROW, S. J., MAC EWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**, p.402 – 424, 2007.

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

WELLE, M. M.; BLEY, C. R.; RÜFENACHT, S.; HOWARD, J. Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. **Veterinary Dermatology**, v.19, p.321–339, 2008.

ZEMKE, D.; YAMINI, B; YUZBASİYAN-GURKAN, V. Characterization of an undifferentiated malignancy as a mast cell tumor using mutation analysis in the proto-oncogene c-KIT. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.13, p.341-345, 2001.