

RESSALVA

Alertamos para ausência das páginas pré-textuais não incluídas pelo(a) autor(a) no arquivo original.

1. INTRODUÇÃO

A prevalência das neoplasias nos animais domésticos vem crescendo consideravelmente, sendo atualmente a principal causa de morte entre os cães. Essa maior incidência tem sido atribuída a maior longevidade observada nestes animais e também por uma maior convivência destes com o homem (WITHROW, 2007).

As neoplasias cutâneas e subcutâneas são as mais comuns em cães, representando aproximadamente um terço dos tumores que ocorrem na espécie, e o mastocitoma canino é o tumor cutâneo maligno mais comum (THAMM & VAIL, 2007).

O mastocitoma canino é uma neoplasia de grande importância na clínica oncológica, por ser um tumor extremamente comum e possuir comportamento clínico agressivo e comportamento biológico variado. O prognóstico de cães portadores de mastocitoma está relacionado à classificação histopatológica do tumor, e esta classificação é fundamental no delineamento da conduta terapêutica adequada (HENDERSON & BREWER, 1998; LONDON & SEGUIM, 2003; THAMM & VAIL, 2007).

A enzima cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima indetectável na maioria dos tecidos, mas pode ser induzida por sinais pró-inflamatórios, além de estar relacionada com a produção de prostaglandinas que modulam eventos fisiológicos do desenvolvimento e processos cicatriciais. Atualmente, acredita-se que esta enzima seja responsável por vários eventos celulares nas

neoplasias como a iniciação, promoção, progressão e metástases (CAO & PRESCOTT, 2002; WANG & DUBOIS, 2004).

Em decorrência desses dados, estudos imunoistoquímicos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a expressão da enzima cicloxigenase-2 nos tecidos neoplásicos e pré-neoplásicos em humanos e animais (DORÉ et al., 2003).

Os macrófagos representam a primeira linha de mecanismos de defesa do organismo. Possuem múltiplas funções, tais como: remodelação tecidual, inflamação e imunidade, incluindo fagocitose, citotoxicidade, secreção de várias citocinas, fatores de crescimento, fatores da coagulação, proteases, entre outros (BINGLE et al., 2002; SICA et al., 2002).

O papel dos macrófagos na progressão tumoral é complexo e multifacetado. Na maioria dos tumores, as células tumorais e os macrófagos apresentam uma relação simbiótica, onde células tumorais atraem macrófagos e sustentam sua sobrevivência, e estes por sua vez produzem fatores que promovem o crescimento tumoral e a angiogênese, embora, os macrófagos produzam citocinas e enzimas líticas com efeitos anti-tumorais (BINGLE et al., 2002).

A intrincada relação entre o tecido tumoral e as células do hospedeiro requer mais estudos a fim de se entender a influência da infiltração de leucócitos, especialmente de macrófagos, nos tumores e com isso possibilitar o desenvolvimento de terapias mais específicas contra o câncer. O resultado do limitado entendimento da biologia dos macrófagos associados ao tumor,

conhecidos como TAM, e seus produtos, no contexto tumoral necessitam de pesquisas buscando-se entender essa mediação (SICA et al., 2002).

Frente ao exposto esse trabalho tem por objetivo avaliar a expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) e de macrófagos associados ao tumor (TAM), em mastocitomas de diferentes graus histológicos e em tecidos normais de cães e correlacionar esses achados ao perfil do animal portador do tumor e à evolução clínica dos casos, visando estabelecer o prognóstico baseado na expressão dos anticorpos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. MASTOCITOMA

O mastocitoma canino é a neoplasia maligna constituída por mastócitos e representa sete a 21% dos tumores cutâneos e 11 a 27% de todos os tumores malignos cutâneos. Foi descrito pela primeira vez por BASHFORD et al., em 1905 e sua etiologia ainda é desconhecida (ROGERS, 1996; FAN et al., 2001).

Mastócitos são componentes normais do tecido conjuntivo, responsáveis pela resposta imune, inflamatória e regulação da homeostase tecidual. Estão presentes em altas concentrações nos pulmões, mucosa intestinal, derme e tecidos perivasculares (IWATA et al., 2000). Derivados quase que exclusivamente da medula óssea, migram para os tecidos via sangüínea (TARDY et al., 1992; CURRY et al., 1998; GINN et al., 2000; FAN et al., 2001). Mastócitos maduros são caracterizados por numerosos grânulos intracitoplasmáticos contendo componentes mediadores e substâncias biologicamente ativas como a heparina, histamina, fator quimiotático para eosinófilos e prostaglandinas (CURRY et al., 1998).

O mastocitoma é um tumor de células redondas e deve ser diferenciado do histiocitoma, linfoma cutâneo, tumor venéreo transmissível (variante cutânea), plasmocitoma cutâneo – extramedular (TORTELLY et al., 2000) e melanoma (FOX, 1998).

2.1.1. Apresentação Clínica

O mastocitoma pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais freqüente em cães entre oito e nove anos de idade. As raças onde se observa maior incidência de mastocitoma são os Boxers, Boston Terries, Buldogues, Beagles e Labradores. Não há evidências de predisposição sexual (FOX, 1998; HENDERSON & BREWER, 1998; LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007).

A forma cutânea do mastocitoma é caracterizada por nodulações avermelhadas na derme, não encapsuladas, com tamanho variando de 1 a 30cm de diâmetro. Esses nódulos podem ser múltiplos ou solitários, de consistência firme, e muitas vezes infiltrados no subcutâneo e na musculatura circunvizinha (MADEWELL & THIEILEN, 1987; FOX, 1998). A maioria dos mastocitomas se estendem além das bordas palpáveis (HOTTENDORF & NIELSEN, 1968).

O mastocitoma pode ocorrer em todo o corpo, mas aproximadamente 50% deles estão localizados no tronco e períneo, 40% nos membros e 10% na cabeça e pescoço (FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000). TARDY et al. (1992) observaram maior agressividade na forma cutânea quando localizado na região inguinal, perineal, prepucial, escrotal e nas articulações.

Mais raramente, o mastocitoma pode se apresentar na forma visceral e disseminada, caracterizando-se principalmente por massas no baço, fígado, mediastino, pulmões e linfonodos. O mastocitoma visceral não está necessariamente associado com a forma cutânea (POLLACK et al., 1991).

Metástases ocorrem em linfonodos regionais em aproximadamente 76% dos casos. Outros órgãos como baço, fígado e medula óssea também são acometidos com frequência (MACY, 1985).

Os sinais clínicos são dependentes da localização e tamanho do tumor, bem como das complicações secundárias (THAMM & VAIL, 2007). As alterações sistêmicas podem ocorrer devido a degranulação dos mastócitos e a subsequente liberação de heparina e histamina. A histamina pode estimular os receptores gástricos de H₂, resultando em uma excessiva secreção ácida e hipermotilidade, podendo levar a formação de úlceras gástricas e duodenais. Clinicamente o animal pode apresentar anorexia, vômito, diarreia e melena (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000). Coagulopatias estão associadas aos mastocitomas devido à liberação de heparina (MACY, 1985; TORTELLY et al., 2000).

2.1.2. Diagnóstico e Comportamento Biológico

O diagnóstico preciso é importante para escolha apropriada do tratamento e determinação do prognóstico (RECH et al., 2004). A citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) é provavelmente o método mais simples para o diagnóstico do mastocitoma canino, e deve ser realizado antes da cirurgia. Porém a histopatologia é necessária para confirmar o diagnóstico, graduar o tumor e determinar se as margens cirúrgicas estão livres de células neoplásicas, além de ser, muitas vezes a única forma de realizar o diagnóstico

definitivo de neoplasias pouco diferenciadas (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; SUEIRO et al., 2002; LAVALLE et al., 2004, RECH et al., 2004).

Em 1973, BOSTOCK desenvolveu um critério de classificação onde os mastocitomas eram classificados em três categorias, baseados em uma série de critérios, incluindo o diâmetro nuclear e citoplasmático, frequência de figuras de mitose, grau de pleomorfismo celular, natureza dos grânulos citoplasmáticos e celularidade. Em 1984, PATNAIK et al., desenvolveram um trabalho semelhante, estabelecendo a classificação mais aceita hoje em dia: mastocitoma de grau I, II, e III, conforme o grau crescente de anaplasia celular. Ambos os pesquisadores relacionavam o prognóstico do portador dessa neoplasia com sua sobrevivência, sendo sempre menor quanto maior o grau de malignidade do tumor.

2.1.3. Tratamento e Prognóstico

A excisão cirúrgica ampla consiste no tratamento mais apropriado para a maioria dos casos de mastocitoma canino (FOX, 1998; MURPHY et al., 2004; SIMPSON et al., 2004; THAMM & VAIL, 2007). Embora estes tumores possam apresentar-se como massas macroscopicamente delimitadas, microscopicamente, a maioria estende-se além das bordas palpáveis (GILSON & STONE, 1990; SIMPSON et al., 2004). Desse modo, admite-se que as margens de segurança para a excisão devam ser de no mínimo 3cm, e todas devem ser histologicamente avaliadas (ROGERS, 1996; SIMPSON et al., 2004;

THAMM & VAIL, 2007). A manutenção das margens de segurança não é possível quando o tumor está localizado em áreas de difícil acesso cirúrgico (região facial, extremidade de membros), nesses casos deve-se optar por cirurgias radicais como a amputação do membro ou terapias adjuvantes (radioterapia, criocirurgia) (POLLACK et al., 1991; FOX, 1998; THAMM & VAIL, 2007).

A recidiva tumoral é comum após excisão cirúrgica como única forma de tratamento (MACY, 1985; LAVALLE et al., 2004). Segundo MACY (1985) recidivas ocorrem em aproximadamente 50% dos casos de mastocitoma, enquanto outra pesquisa relata a recorrência em 30% dos casos (LAVALLE et al., 2004). Essa percentagem de recidiva pode ser estimada, em grande parte, pela classificação histológica (MACY, 1985). Dois estudos reportaram recorrência local de 5% a 21% após excisão completa de mastocitoma grau II (SEGUIN et al., 2001; WEISSE et al., 2002).

A histopatologia é de fundamental importância, pois além de ser um importante fator prognóstico vai determinar a necessidade e escolha da terapia adjuvante (ROGERS, 1996; BAKER-GABB et al., 2003; MURPHY et al., 2004; THAMM & VAIL, 2007). Uma vez que, geralmente, a excisão cirúrgica completa promove a cura de cães com mastocitoma grau I (HOTTENDORF & NIELSEN, 1967; LONDON & SEGUIN, 2003). No caso de tumores pouco diferenciados ou com evidência do envolvimento do linfonodo regional, ou ainda de doença sistêmica, indica-se a excisão tumoral seguida de terapia adicional (MACY, 1985). No entanto, há controvérsias quanto ao tratamento adequado de mastocitoma de grau intermediário (THAMM & VAIL, 2007). Existem estudos

que relatam a cura de cães submetidos somente ao procedimento cirúrgico adequado (BOSTOCK, 1973), enquanto outros indicam terapia adjuvante pós-operatória (THAMM & VAIL, 2007).

Entre as várias terapias adjuvantes propostas são citadas: quimioterapia, radioterapia, criocirurgia, hipertermia, braquiterapia intralesional, além de outras (THAMM & VAIL, 2007). A quimioterapia antineoplásica e a radioterapia são os tratamentos adjuvantes mais indicados em cães com mastocitoma (LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007). São descritos vários protocolos quimioterápicos com indicação e efetividade variada (ROGERS, 1996; HENDERSON & BREWER, 1998; SIMPSON et al., 2004; THAMM & VAIL, 2007).

Muitos cães com mastocitoma têm uma sobrevida média de seis meses, seja por recidiva ou por metástase. Este é um dos motivos que mostra a necessidade de uma avaliação preditiva e investigativa nos mastocitomas cutâneos caninos (BOSTOCK et al., 1989).

2.2. CICLOXIGENASE-2

A inflamação é desencadeada pela liberação de mediadores químicos originados dos tecidos lesados, que provocam distúrbios na membrana celular ocasionando a ativação da fosfolipase A₂ e liberação do ácido araquidônico. O ácido araquidônico, quando liberado, não tem ação inflamatória, entretanto, os

produtos de sua degradação, são mediadores fundamentais para o desenvolvimento do processo inflamatório (TASAKA, 1999).

A oxidação do ácido araquidônico pode ser realizada por duas vias enzimáticas: cicloxigenase (também conhecida como PGH sintetase) e a lipoxigenase. A ação do sistema enzimático da cicloxigenase sobre os fosfolípidios de membrana converte o ácido araquidônico em uma prostaglandina endoperóxida estável (PGG_2), que é subsequentemente reduzida para PGH_2 . Esta então pode ser usada como substrato para sintetizar várias prostaglandinas, como a PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$. A PGH_2 pode ser ainda convertida em prostaciclina (PGI_2) ou tromboxano (TXA_2) (MONTENEGRO & FRANCO, 1999; SLAUSON & COOPER, 2002).

Por muito tempo, somente um tipo de enzima cicloxigenase era conhecido, mas verificou-se a existência de pelo menos dois tipos de cicloxigenases, que determinam no organismo funções fisiológicas diferentes, sendo referidas então, como COX-1 (constituente) e COX-2 (induzida) (TASAKA, 1999; SLAUSON & COOPER, 2002).

A COX-1 é uma enzima que precisa estar disponível e funcional no organismo. Ela produz prostaglandinas responsáveis pela função fisiológica de citoproteção gástrica, manutenção da homeostase renal e da função plaquetária (SUBBARAMAIAH et al., 1996; BREYER & HARYS, 2001). A inibição da COX-1 conduz a efeitos colaterais bem conhecidos, como as úlceras gástricas e a toxicidade renal (MURRAY & BRATER, 1993; DAVIES, 1995).

A COX-2 diferentemente é indetectável na maioria dos tecidos, mas pode ser expressa em resposta a certos estímulos, tais como a 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), endotoxinas bacterianas e oncogenes (BURLEIGH, 2002; KRAUS, 2003).

Sabe-se que grande parte dos antiinflamatórios não esteroidais atualmente utilizados na terapêutica bloqueia tanto a COX-1 quanto a COX-2 (TASAKA, 1999). Os coxibes, uma nova geração de antiinflamatórios não esteroidais, são inibidores seletivos da COX-2, por essa razão, esse tipo de fármaco tem sido mais utilizado no controle da inflamação, evitando os efeitos adversos sobre o trato gastrointestinal causado pela inibição da COX-1 (BURLEIGH, 2002; WOLFESBERGER et al., 2006).

2. 2.1. Cicloxigenase-2 e o Câncer

A teoria que fármacos antiinflamatórios podem afetar a carcinogênese iniciou a relação entre a inflamação crônica e o câncer (SWIERGIEL & DUNN, 2002). Com base nesses dados, nas últimas duas décadas, várias pesquisas clínicas, experimentais e epidemiológicas têm correlacionado o desenvolvimento e progressão tumoral com a presença da cicloxigenase, nas células neoplásicas humanas (BEAM et al., 2003).

A cicloxigenase-2 é 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). Já a COX-1 estava expressa igualmente em tecido neoplásico e normal.

Ensaio clínico com antiinflamatórios não esteróides em humanos com pólipos adenomatosos evidenciaram claramente que o tratamento com estes medicamentos promove a regressão dos adenomas pré-existentes (GIARDIELLO et al., 1995).

Estudos epidemiológicos com pacientes humanos que foram tratados por longos períodos com antiinflamatórios não esteroidais indicaram uma significativa redução no risco de desenvolvimento de carcinoma de cólon e reto (SMALLEY & DUBOIS, 1997).

A exata função da cicloxigenase-2 na progressão do câncer tem se tornado alvo de várias pesquisas. A super 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).

A expressão aumentada da COX-2 leva a alta concentração de prostaglandinas, especialmente a E₂ (PGE₂). A PGE₂ está relacionada à

resistência a apoptose, promoção da angiogênese, capacidade de invasão e indução de imunossupressão (DEMPKE et al., 2001).

A cicloxigenase-2 modula a angiogênese pela produção de fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que determina a habilidade em estimular o crescimento de células endoteliais e promover a angiogênese. A formação de novos vasos sanguíneos é fundamental também para a ocorrência de metástases (NIJSTEN et al., 2004; WANG & DUBOIS, 2004).

Trabalhos com culturas celulares, realizados por TSUJII & DUBOIS (1995), demonstraram que a expressão para a COX-2 contribui significativamente no potencial carcinogênico das células epiteliais devido a elevação da resistência aos sinais de apoptose. A resistência a apoptose pode prolongar a sobrevivência de células anormais, permitindo assim maior tempo para a acumulação de mutações genéticas múltiplas, resultando em alterações fenotípicas e promoção do crescimento celular do tumor (CAO & PRESCOTT, 2002).

A expressão da cicloxigenase-2 apresenta correlação positiva com a capacidade de invasão tecidual pelas células neoplásicas (SOUZA et al., 2000), e sua elevada expressão foi correlacionada a diminuição da expressão de E-caderina, proteína que está envolvida com a adesão celular, em epitélio intestinal de ratos (TSUJII & DUBOIS, 1995).

A ação quimiopreventiva e anti-tumoral dos inibidores de COX-2 em câncer de bexiga, cólon e outros carcinomas têm sido documentada na literatura oncológica humana (KAWAMORI et al., 1998; HENRY, 2003).

2.3. MACRÓFAGO

Os macrófagos são componentes essenciais do sistema imune inato. Eles são liberados da medula óssea como monócitos imaturos, e após circularem na corrente sanguínea, migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos residentes. Estas células podem ser encontradas em quase todos os tecidos do organismo e, dependendo do micro ambiente local, adquirem características fenotípicas especializadas. Macrófagos exibem funções diversas, incluindo fagocitose, apresentação de antígeno, citotoxicidade antimicrobiana, remodelação tecidual e secreção de uma grande variedade de fatores de crescimento, citocinas, componentes do complemento, prostaglandinas e enzimas (ROSS, 2002).

A primeira descrição da presença de leucócitos em tumores humanos foi feita por Virchow em 1863, que refletiu sobre a presença de câncer em locais com inflamação crônica prévia. Atualmente é estabelecido que macrófagos representam o principal componente do infiltrado leucocitário na maioria dos tumores malignos. Estes são denominados de macrófagos associados a tumores (TAMs), e apesar da maioria ser derivada de monócitos periféricos recrutados da circulação para a massa tumoral, há evidências da proliferação local de macrófagos (McBRIDE, 1986; YAMASHIRO et al., 1994; BINGLE et al., 2002).

No câncer, os macrófagos exercem atividades que podem prevenir o estabelecimento e dispersão de células tumorais, e simultaneamente, podem

ter funções para estimular o crescimento e disseminação do tumor (BINGLE et al., 2002; SICA et al., 2002; MURDOCH et al., 2004).

Macrófagos podem apresentar citotoxicidade direta contra células tumorais por produzir moléculas citotóxicas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α), óxido nítrico e intermediários reativos ao oxigênio, assim como por estimular rápida resposta linfocitária pela apresentação de antígenos tumorais e produção de interleucina -12 (IL-12). Alternativamente, TAMs podem promover o crescimento do tumor por secretar fatores de crescimento que promovem a proliferação, invasão e metástase de células tumorais, como também a vascularização tumoral. Eles também inibem a atividade dos linfócitos no tumor por produzirem citocinas imunossupressoras como a IL-10 e prostaglandinas (BLANKENSTEIN et al., 1991; BINGLE et al., 2002; SICA et al., 2002; MURDOCH et al., 2004).

Existe uma relação, às vezes contraditória, entre TAM e o prognóstico tumoral de vários tumores humanos (BINGLE et al., 2002; SICA et al., 2002; MURDOCH et al., 2004). Enquanto a extensa presença de TAM tem denotado a correlação com pior prognóstico em carcinoma de mama, cérvix e bexiga, seu papel é controverso em tumores de próstata, pulmão e cérebro (BINGLE et al., 2002).

Pesquisas realizadas com câncer de mama em mulheres verificaram que a elevada expressão de TAM está correlacionada ao pior prognóstico (LEEK et al., 1996; LEE et al., 1997; GOEDE et al., 1999; LEEK et al., 2000). A extensa infiltração de TAM mostrou-se interligada com tumores de alto grau, tumores volumosos e necrose tumoral (LEE et al., 1997).

Há estudos controversos sobre o papel de TAM em homens com carcinoma prostático (BINGLE et al., 2002). Alguns desses correlacionam o aumento do número de TAM com prognóstico ruim, associando TAM à angiogênese tumoral (LISSBRANT et al., 2000). No entanto, SHIMURA e colaboradores (2000) relacionaram os TAM com bom prognóstico, pois a expressão de TAM em tumores agressivos foi menor quando comparado a tumores menos agressivos. Além deste achado, a redução de TAM foi correlacionada com a incidência de metástases em linfonodos.

2.4. Cicloxigenase-2, Macrófagos e o Câncer.

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 cicloxigenase-2 (COUSSENS & WERB, 2001).

Pesquisa realizada com lesões prostáticas evidenciou correlação positiva entre a expressão de COX-2, angiogênese e locais com inflamação crônica (lesões benignas e malignas). A presença de COX-2 na hiperplasia prostática inflamatória benigna é resultante da liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e linfócitos T, presentes no micro ambiente

tecidual. Nas neoplasias a COX-2 pode ser induzida por citocinas originadas tanto de células inflamatórias quanto de células tumorais (WANG et al., 2005).

Klimp et al. (2001) observaram que a expressão de COX-2 em neoplasias ovarianas, benignas e malignas, não apresentou correlação entre a imunomarcacão e a graduação histológica. Entretanto, a expressão de macrófagos foi crescente, conforme a graduação de malignidade dos tumores.

Nas neoplasias mamárias de cadelas, a expressão da cicloxigenase-2 variou de acordo com a classificaçao histológica tumoral, observando-se baixa expressao nas células dos adenomas e alta nos carcinomas e carcinomas metastáticos. Além disso, a sobrevida dos animais foi proporcional a imunomarcacão de COX-2 (DE NARDI, 2006).

Estudo realizado com neoplasias mamárias em mulheres mostrou que a alta infiltração de macrófagos está intimamente relacionada à angiogênese, recidiva tumoral e baixa sobrevida (LEEK et al., 2000).

Sickert et al. (2004) verificaram o aumento do número de macrófagos em tecido tumoral de cólon humano quando comparado à mucosa normal da mesma espécie, indicando que os macrófagos são quimioatraídos para o tumor, entretanto, o decréscimo de TAM observado em neoplasias de alto grau de malignidade, sugere que essa atração decresce com a progressão tumoral.

Diversos estudos que avaliaram a expressão de COX-2 em câncer de cólon humano denotaram imunomarcacão crescente de COX-2 conforme a graduação histológica e correlacionaram ainda esses achados ao tamanho tumoral, angiogênese e inibiçao da apoptose (TSUJII et al., 1998; SHEEHAN et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos Casos

Para a realização deste estudo foram selecionados 24 casos de mastocitoma canino, atendidos nos anos de 2001 a 2005, no Serviço de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal. Em todos os casos, após cirurgia específica, efetuava-se a colheita da amostra contendo tecido neoplásico e tecido normal adjacente para a classificação histopatológica do tumor.

Amostras de tecido cutâneo e subcutâneo, de locais aleatórios, sem alterações patológicas macroscópicas foram coletadas (grupo controle – G0), de cinco cães hígidos.

Os espécimes tumorais e de tecido cutâneo e subcutâneo sem alterações foram fixados em solução de formol a 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 do Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP - Câmpus de Jaboticabal.

Cortes de cinco micrômetros de espessura corados pela Hematoxilina-eosina (H.E.) e Azul de Toluidina (A.T.) foram utilizados para a observação

histológica, o que permitiu confirmar o diagnóstico e classificar os tumores, segundo os critérios de PATNAIK et al. (1984) (Figura 1).

Os espécimes de tecido cutâneo e subcutâneo (G0) empregados não evidenciaram alterações histopatológicas.

Após a coloração em H.E. e A.T. os cortes foram avaliados por patologista e separados em grupos experimentais, sendo G0 (n =5), grupo controle; G1 (n = 8), constituídos por mastocitoma grau I, G2 (n = 8) por mastocitoma grau II; G3 (n = 8) por mastocitoma grau III.

Os animais dos grupos G1, G2 e G3 tiveram seus prontuários analisados em relação a raça, sexo e idade, visando caracterizar os dados de prevalência dessas neoplasias nesta população de cães acometidos. Todos os cães selecionados para este experimento não tinham histórico de tratamento com antiinflamatórios esteroidal ou não esteroidal previamente ao diagnóstico e coleta de tecido para que não houvesse interferência com a expressão da cicloxigenase-2 (COX-2).

3.2. Estudo Imunoistoquímico

O estudo imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP - Câmpus de Jaboticabal. O método imunoistoquímico utilizado foi o complexo avidina-biotina (ABC), desenvolvido por Hsu et al. (1981).

Cortes de cinco micrômetros 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.

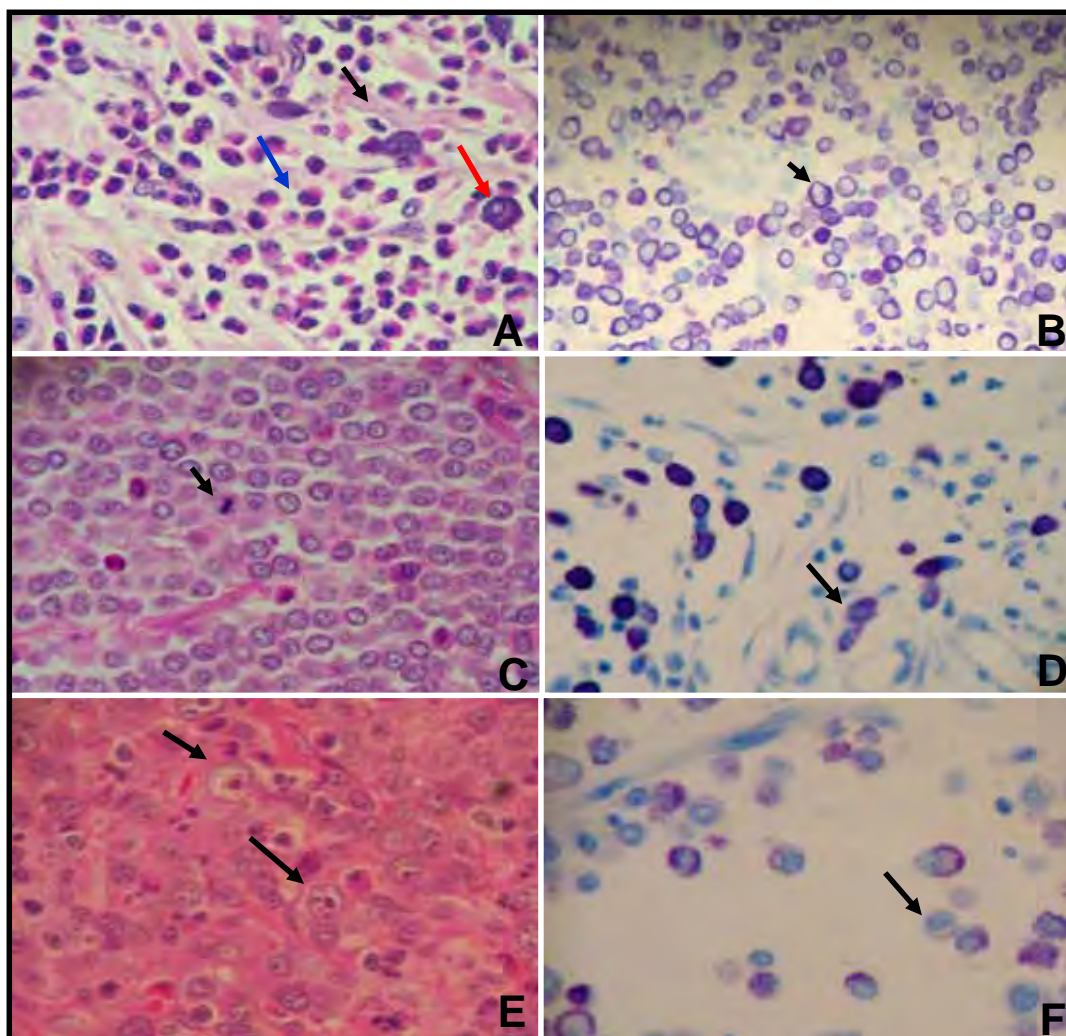


Figura 1- Fotomicrografias de mastocitomas de cães utilizados neste estudo, com aumento de 400 vezes, (A, C e E coloração de Hematoxilina-eosina); (B, D e F coloração de Azul de Toluidina): **(A)** Mastocitoma grau I, notar citoplasma com bordas bem definidas nos mastócitos (seta vermelha), presença de eosinófilos (seta azul) e tecido conjuntivo entremeado ao tumor (seta preta); **(B)** Mastocitoma grau I, mostrando marcação positiva para a maioria dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos (seta); **(C)** Mastocitoma grau II, notar figura de mitose (seta); **(D)** Mastocitoma grau II, notar células com redução de grânulos no citoplasma (seta) e moderado pleomorfismo celular; **(E)** Mastocitoma grau III, notar acentuado grau de pleomorfismo celular e nuclear, com nucléolos bem evidentes (setas); **(F)** Mastocitoma grau III, notar degranulação citoplasmática acentuada de mastócitos (seta).

Antes do início da reação, as lâminas com os cortes fixados foram deixadas em estufa a 37°C por 60 minutos e em seguida passaram por desparafinização e hidratação, em xilol e graduações decrescentes de etanol, respectivamente. Após a lavagem em água destilada foi realizado o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por meio de imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 10% em metanol, por 30 minutos. Na seqüência foi utilizada a recuperação antigênica pelo calor 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, nºS1699) de acordo com as recomendações do fabricante. Após o resfriamento das lâminas, estas foram lavadas com solução tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M e pH 7,2, por 5 minutos com três repetições (padrão de lavagem adotado) e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente com solução bloqueadora de reação inespecífica (protein block serum free, Dakocytomation, nºX0909). Nova lavagem foi realizada com PBS e os cortes foram incubados, durante toda a noite a 4°C, com os anticorpos primários de acordo com as determinações específicas de cada anticorpo (Tabela 1). Após essa etapa, realizou-se nova lavagem com PBS. Ato contínuo utilizou-se kit baseado na técnica da avidina-biotina-peroxidase (LSAB+ System – Dakocytomation, nºK690). Inicialmente foi feita a incubação por 30 minutos em temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotilado contra imunoglobulina G de camundongo, coelho e cabra, seguido de nova lavagem e nova incubação com a solução de estreptavidina-peroxidase por mais 30 minutos. Nova lavagem com PBS foi realizada. A observação da reação foi

obtida empregando-se o cromógeno à base de diaminobenzidina (DAB) (liquid DAB substrate-chromogen system – Dakocytomation, nº K3468), incubado por 5 a 8 minutos. Os cortes foram então contracorados com hematoxilina de Harris, diluída na proporção de 1:10 e montados em bálsamo do Canadá.

Como controle negativo, os anticorpos primários anti-COX-2 (CX-294) e anti-macrófagos (MAC 387) foram substituídos por tampão PBS.

Na reação com o MAC 387, como controle positivo, foram utilizados cortes de pulmão canino, que sabidamente expressam macrófagos. Para a cicloxigenase 2 foram utilizados cortes de carcinoma mamário canino.

Tabela 1 - Relação dos anticorpos primários com seus respectivos clones, características, origem, diluições e marca empregados nas reações imunistoquímicas deste estudo. Jaboticabal, 2007.

Anticorpo	Clone	Característica	Origem	Diluição	Marca
Primário					
COX-2	CX-294	monoclonal	camundongo	1:50	Dakocytomation
MAC	MAC 387	monoclonal	camundongo	1:200	Dakocytomation

* COX: Anticorpo contra cicloxigenase-2 (COX-2).

* MAC: Anticorpo contra antígeno de células mielóides e histiocitárias.

3.3. Avaliação da Expressão dos Anticorpos

A observação da freqüência das marcações foi realizada por dois observadores em microscópio óptico 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, utilizando-se 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.

3.4. Avaliação da Sobrevida

A evolução clínica dos animais selecionados para este estudo foi avaliada através de ligações telefônicas aos proprietários, e estes foram questionados quanto à evolução e sobrevida de seus animais após o diagnóstico.

A avaliação da sobrevida foi obtida com o intuito de correlacioná-la a graduação histológica dos tumores e se estabelecer o prognóstico para cada um dos animais deste estudo.

3.5. Análise Estatística

Os dados epidemiológicos, raça, idade, sexo e grau histológico, dos animais selecionados para este estudo foram avaliados pelo teste de Tukey, para comparar as médias entre os subgrupos.

A porcentagem de expressão da marcação para os anticorpos (COX-2 e MAC), foram avaliados pelo teste F e pelo teste de Tukey, para comparar as médias entre os subgrupos.

Os resultados foram analisados pelo Programa Estatístico SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Dados de Frequência

A prevalência racial dos cães portadores de mastocitoma selecionados para este estudo está representada na Figura 2. De acordo com a ocorrência de mastocitomas, 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.

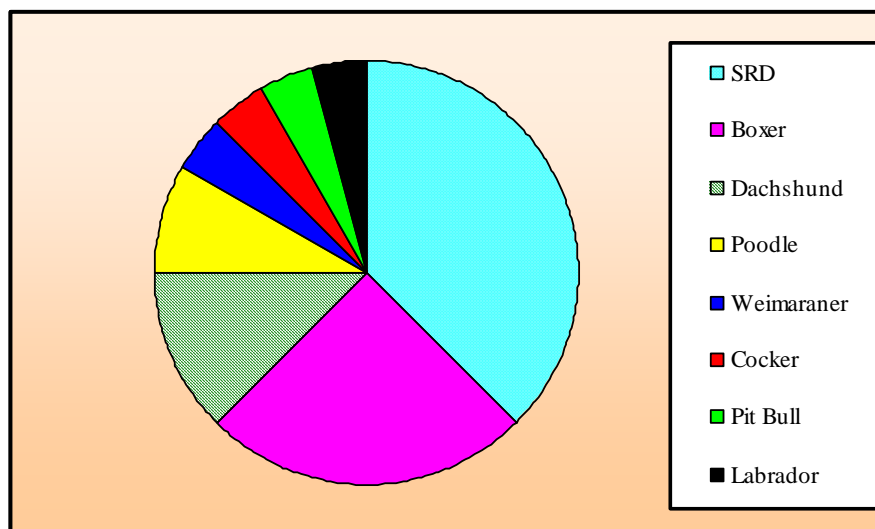


Figura 2- Frequência de mastocitoma, distribuídos conforme a raça dos cães selecionados para este estudo. Jaboticabal, 2007.

A média de idade dos 24 animais portadores de mastocitoma foi de 8,5 anos, sendo distribuídos por faixa etária, em 5 animais (20,83%) entre 1 e 5 anos, 12 animais (50%) entre 6 e 10 anos e 7 animais (20,7%) com idade acima de 10 anos (Figura 3).

Com relação ao sexo, observou-se um número superior de machos (14) em relação às fêmeas (10).

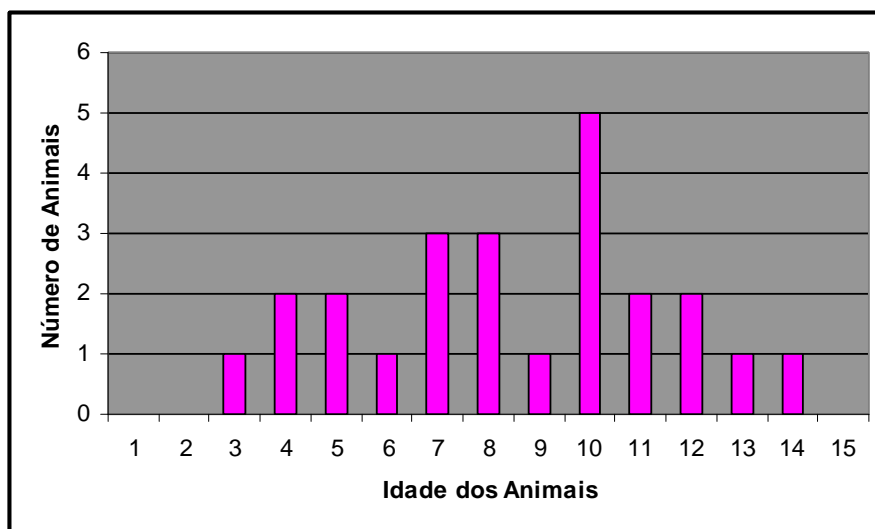


Figura 3- Distribuição dos mastocitomas caninos distribuídos conforme a idade dos animais. Jaboticabal, 2007.

Os dados de prevalência dos animais portadores de mastocitoma, em relação à faixa etária, raça, sexo e gradação histológica não se mostraram significativos ($P > 0,05$).

4.2. Imunorreatividade aos Anticorpos

Na avaliação imunoistoquímica, o número de células marcadas para a atividade da COX-2 e de macrófagos, variou de acordo com a classificação histológica (Figura 4 e 5).

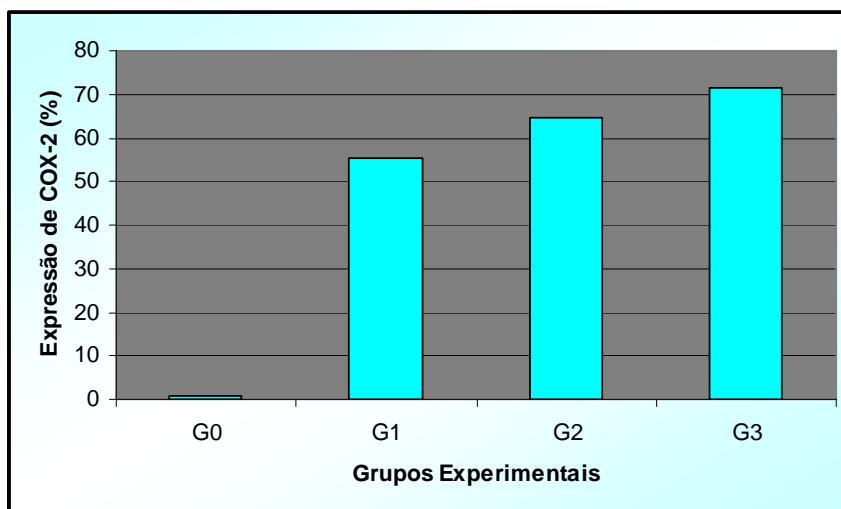


Figura 4 - Porcentagem de marcação da cicloxigenase-2 nos espécimes de mastocitomas dos grupos G1, G2 e G3. Observar a expressão quase nula no grupo controle (G0). Jaboticabal, 2007.

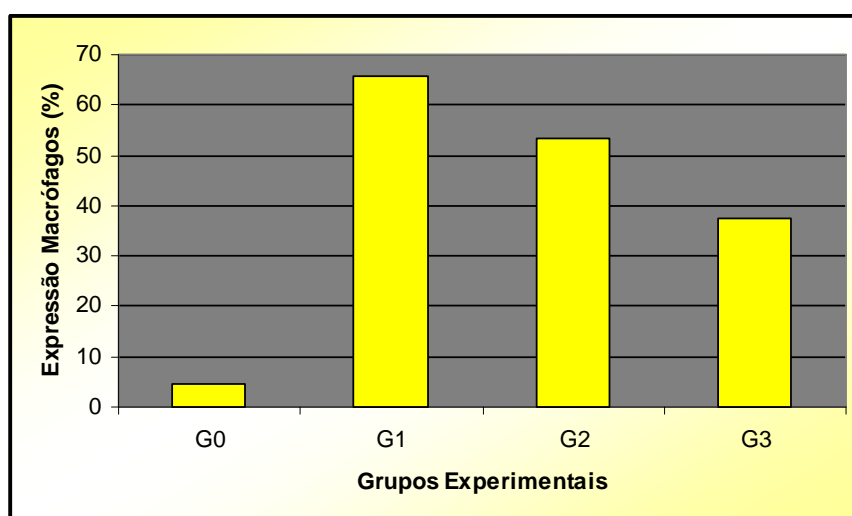


Figura 5 - Porcentagem de marcação de macrófagos nos espécimes de mastocitomas dos grupos G1, G2 e G3. Observar a expressão quase nula no grupo controle (G0). Jaboticabal, 2007.

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 marcação crescente, conforme a gradação de malignidade do tumor (G3>G2>G1). A expressão no grupo dos mastocitomas de grau I foi de 55,4% (Figura 6), nos de grau II foi de 64,6% (Figura 7) e nos mastocitomas de grau III foi de 71,7% (Figura 8).

Também registrou-se baixa expressão de células imunomarcadas por marcadores de macrófagos no grupo controle (1,5%), e o inverso do que se detectou com o marcador de COX-2 foi verificado nos espécimes tumorais, onde tumores de maior malignidade (G3) apresentaram menor expressão de MAC 387 quando comparados aos de menor malignidade (G1). A expressão de macrófagos nos mastocitomas grau I (G1) foi de 65,9% (Figura 9), nos mastocitomas grau II (G2) foi de 53,3% (Figura 10) e nos mastocitomas de grau III (G3) foi de 37,3% (Figura 11).

O resultado da imunomarcação de COX-2 foi significativo ($P<0,05$) quando se comparou o número de células imunomarcadas nos grupos experimentais, houve significância entre o grupo controle (G0) e mastocitoma grau I (G1), grupo controle (G0) e mastocitoma grau II (G2), grupo controle (G0) e mastocitoma grau III (G3) e mastocitoma grau I (G1) e mastocitoma grau III (G3) (Tabela 2).

Também essa comparação foi significativa ($P<0,05$) nos grupos imunomarcados pelo marcador de macrófagos: controle (G0) e mastocitoma grau I (G1), grupo controle (G0) e mastocitoma grau II (G2), grupo controle

(G0) e mastocitoma grau III (G3), mastocitoma grau I (G1) e mastocitoma grau III (G3) e mastocitoma grau II (G2) e mastocitoma grau III (G3) (Tabela 3).

Através da análise de variância pelo teste F verificou-se que houve diferenças entre os grupos experimentais em relação à marcação dos anticorpos. A expressão no grupo G0 para COX-2 e G0 para MAC 387 foram as menores médias de imunomarcação e não diferiram entre si, mas diferiram dos demais grupos experimentais para ambos os anticorpos. Nos grupos G1 e G2 a expressão de COX-2 e macrófagos, não apresentaram diferença significativa entre eles, entretanto a marcação de COX-2 no grupo G2 não diferiu estatisticamente da imunomarcação do mesmo anticorpo no grupo G3. Porém, a expressão de macrófagos no grupo G3, por sua vez, diferiu estatisticamente da marcação de ambos os anticorpos, nos demais grupos avaliados (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias de células imunorreativas a COX-2 e macrófagos nos espécimes analisados. Jaboticabal, 2007.

Grupos experimentais	COX-2(%)	Macrófago(%)
G0	0,43 a	1,5 a
G1	55,4 b	65,9 b
G2	64,6 bc	53,3 b
G3	71,7 c	37,3 d

- Porcentagem seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

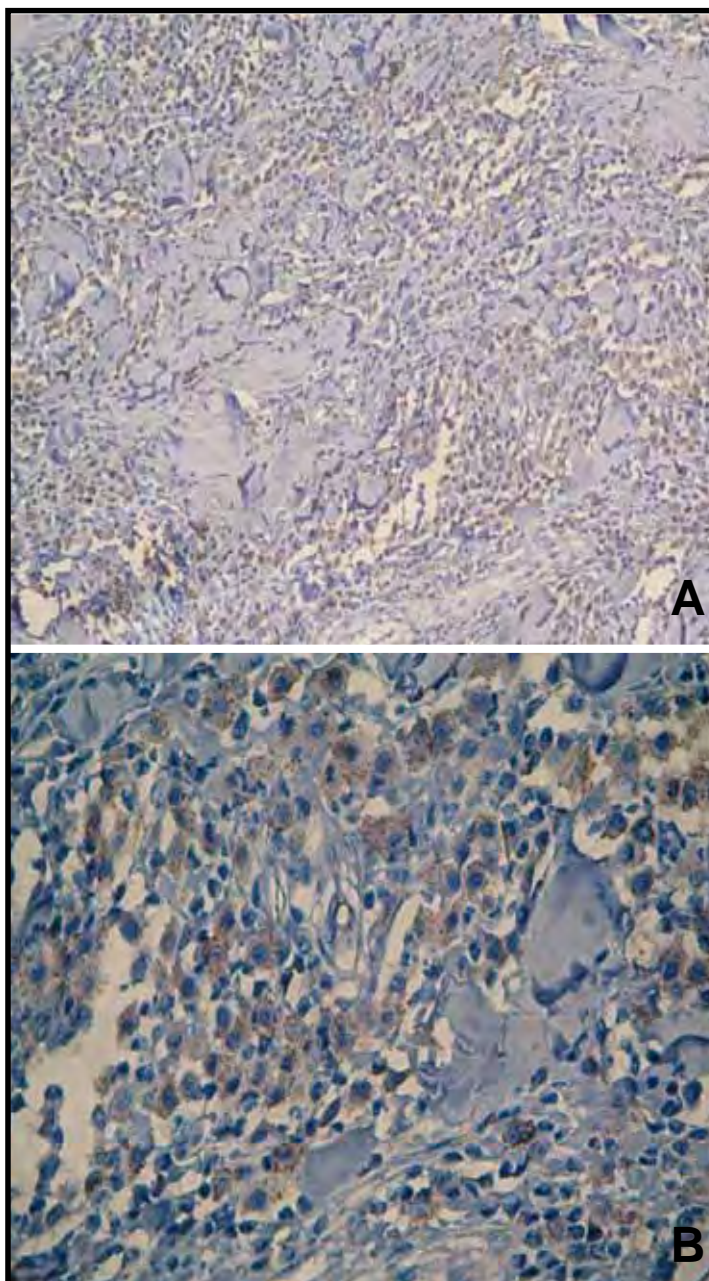


Figura 6 · Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau I (G1), submetidos à reação de imunohistoquímica pelo método ABC, utilizando o anticorpo anti-COX-2, clone CX 294. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas, de intensidade moderada; **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

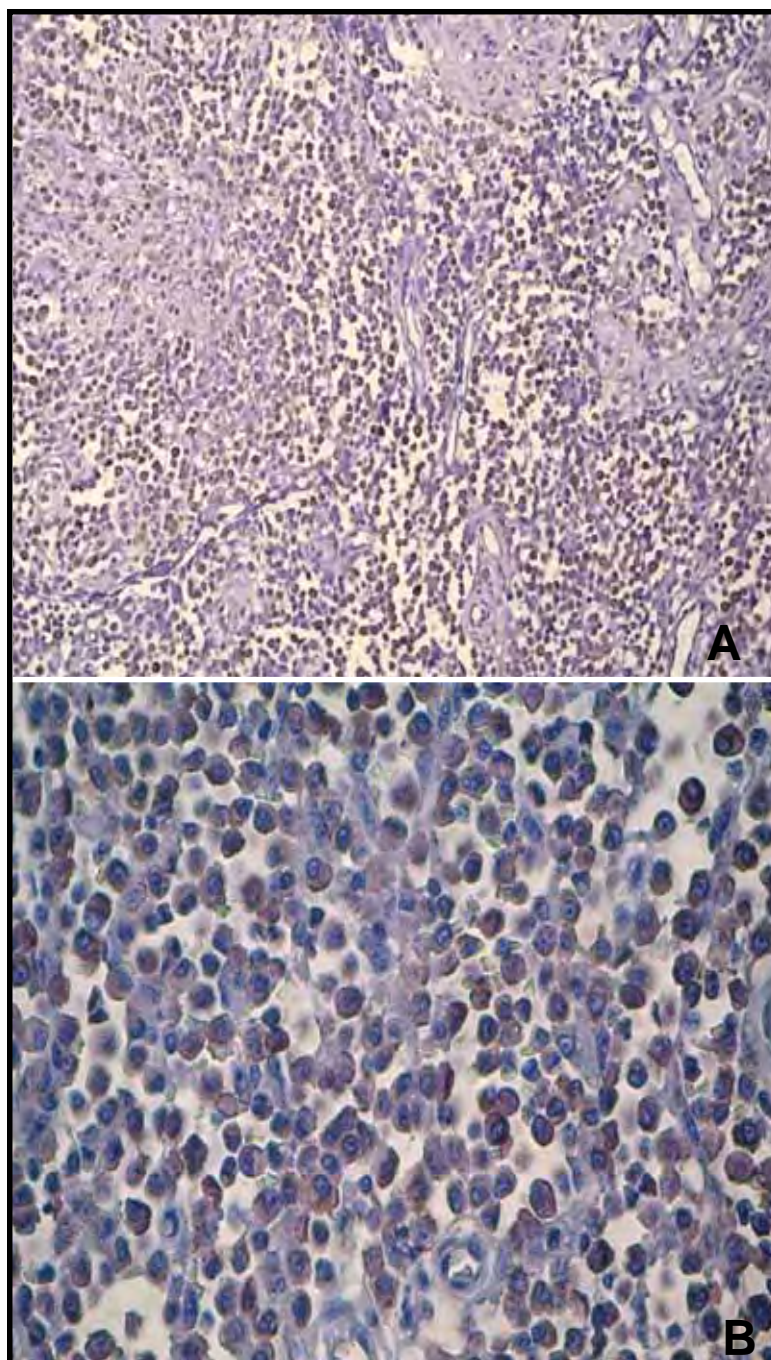


Figura 7 - Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau II (G2), submetidos à reação de imunohistoquímica pelo método ABC, utilizando o anticorpo anti-COX-2, clone CX 294. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas, de intensidade moderada; **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

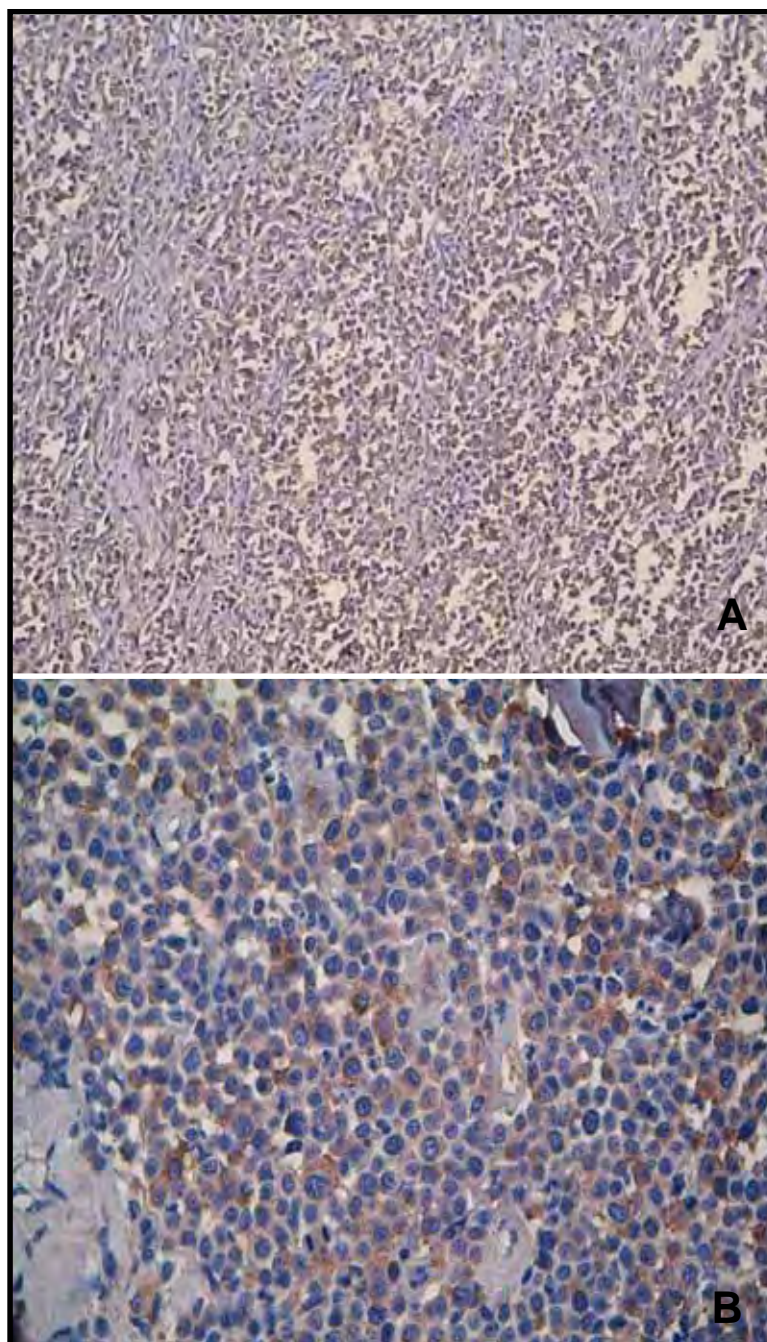


Figura 8 - Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau III (G3), submetidos à reação de imunistoquímica pelo método ABC, ilustrando grande número de células neoplásicas marcadas para atividade da COX-2. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas, de intensidade moderada a intensa; **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

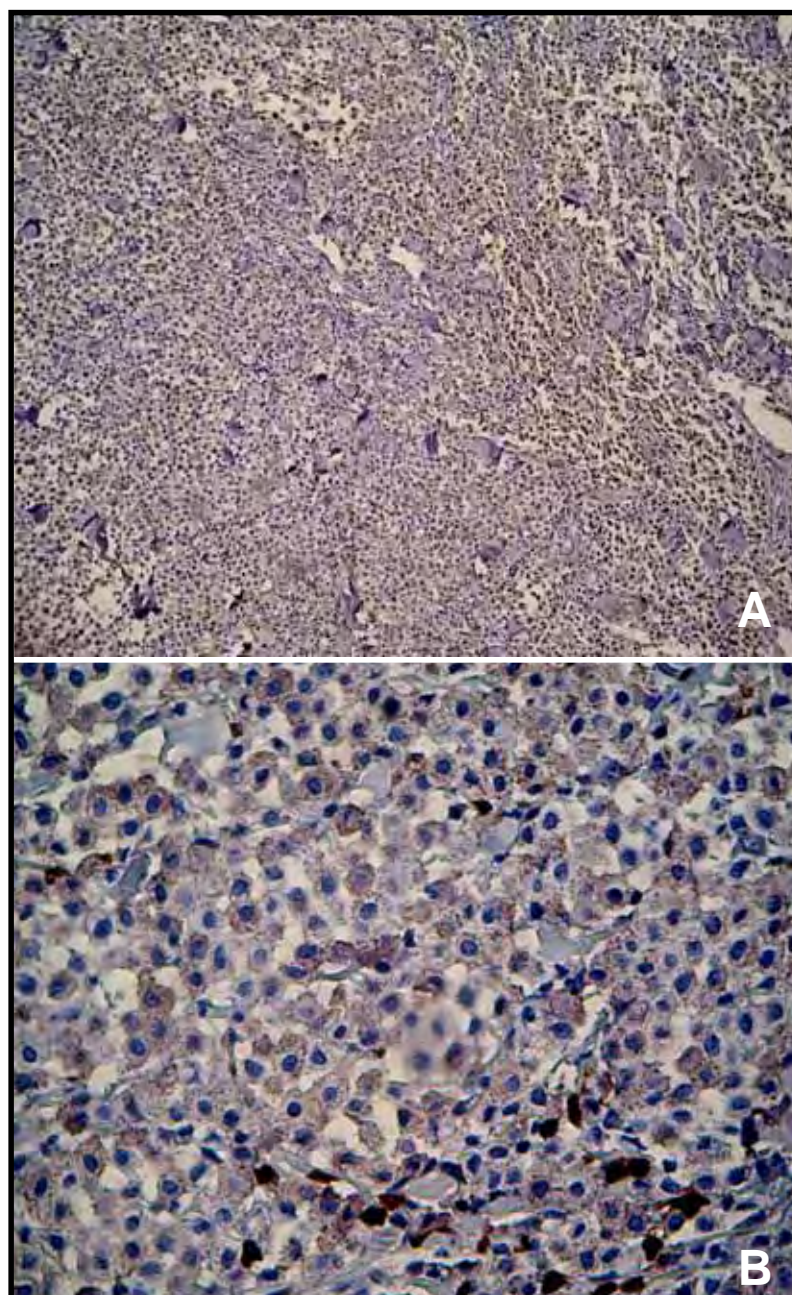


Figura 9 - Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau I (G1), submetidos à reação de imunohistoquímica pelo método ABC, ilustrando grande número de macrófagos associados ao tumor. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas, de intensidade moderada; **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

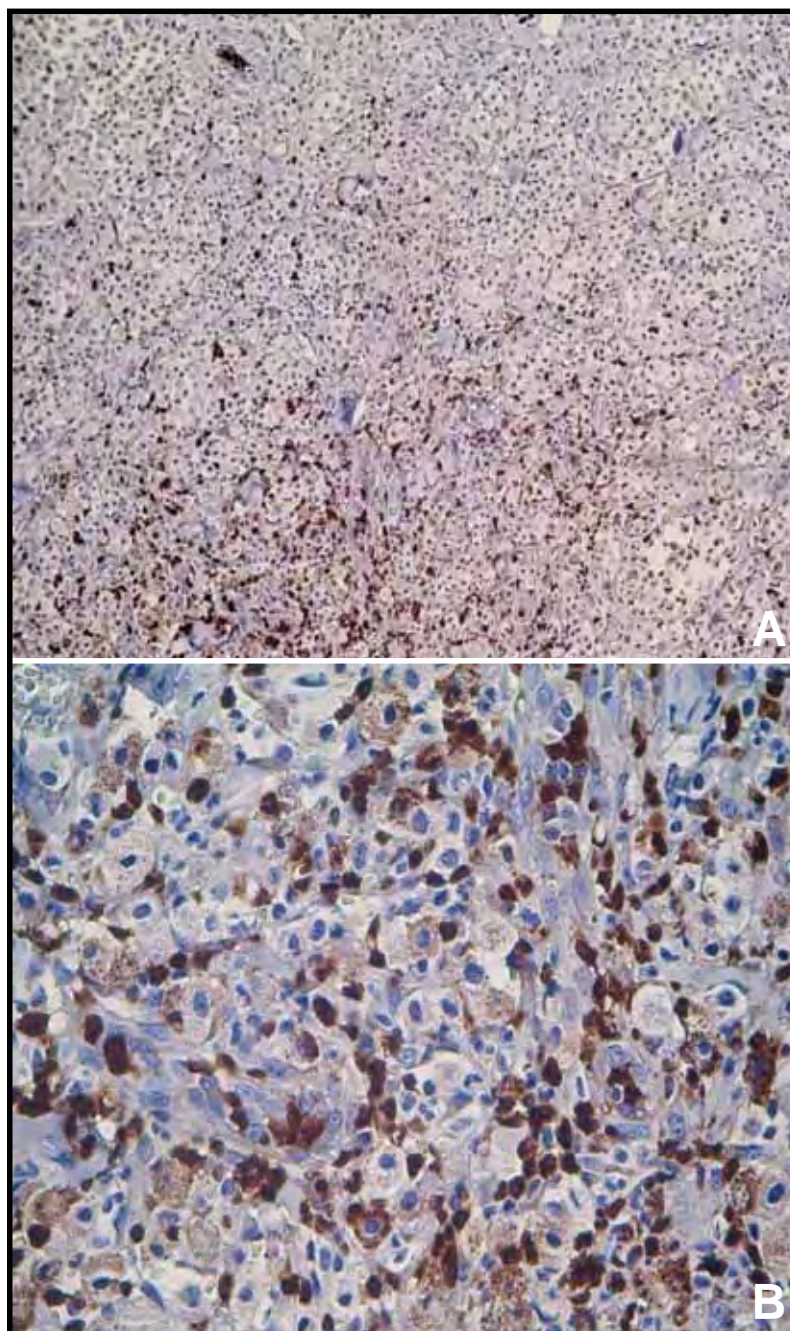


Figura 10 - Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau II (G2), submetidos à reação de imunohistoquímica pelo método ABC, ilustrando grande número de macrófagos associados ao tumor. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas com graus variados de intensidade (de moderada a intensa); **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

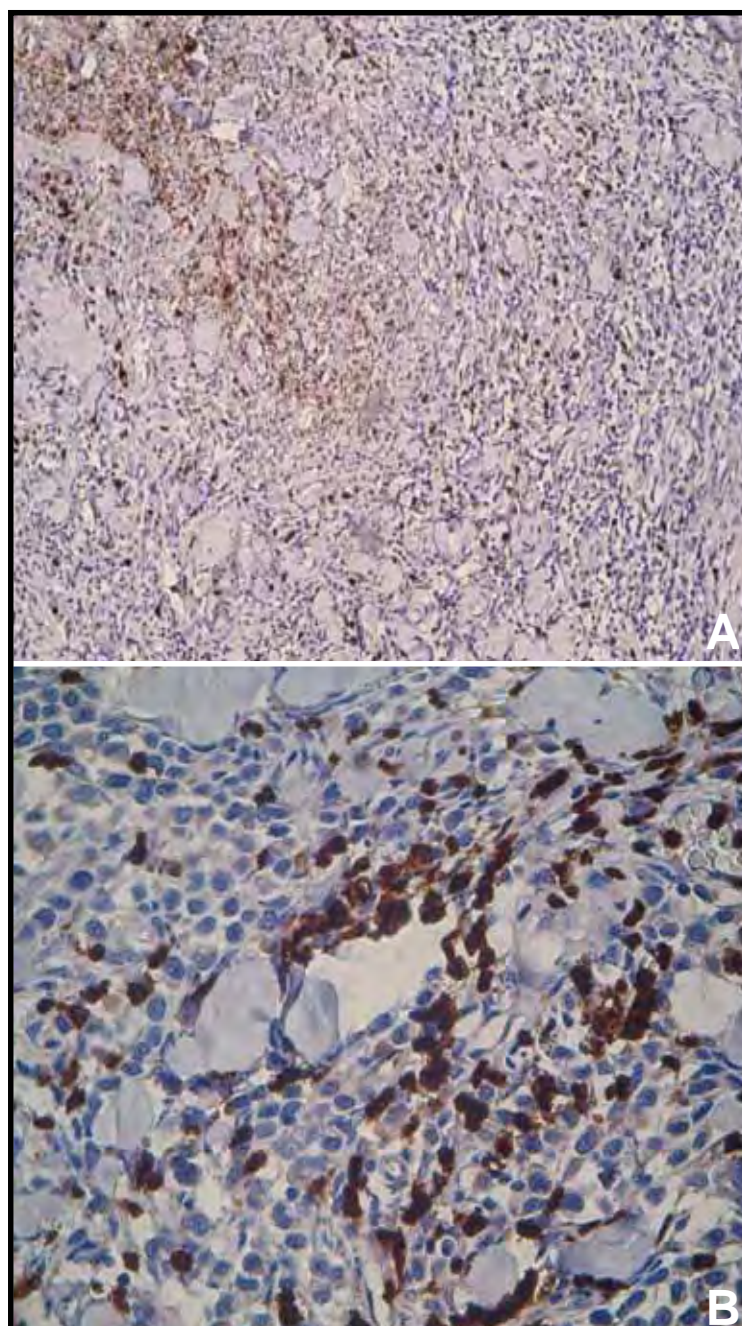


Figura 11 - Fotomicrografias de mastocitomas caninos grau III (G3), submetidos à reação de imunohistoquímica pelo método ABC, ilustrando grande número de macrófagos associados ao tumor. Observam-se marcações citoplasmáticas castanhas intensas; **(A)** aumento de 40 vezes e **(B)** aumento de 400 vezes. Contracoloração: Hematoxilina de Harris. Jaboticabal, 2007.

4.3. Estabelecimento do Prognóstico

Dos 24 animais selecionados para este estudo, em 10 foi avaliada a sobrevida após o diagnóstico. Vale salientar que para obter as informações houve grande dificuldade devido ou à falta de colaboração dos proprietários, ou a mudança do número de telefone ou mesmo a morte de alguns animais por outras enfermidades.

Destes dez cães, quatro (40%) receberam diagnóstico de mastocitoma de grau I, dois (20%) de grau II e quatro (40%) de grau III.

Dos quatro animais portadores de mastocitoma grau I, um teve sobrevida de aproximadamente 18 meses, dois tiveram sobrevida variando 35 a 40 meses, e um, até o presente momento, apresenta sobrevida de 24 meses. Dos dois animais com mastocitoma grau II, um teve sobrevida de 18 meses e o outro de 24 meses. Nos quatro cães com mastocitoma grau III, dois apresentaram sobrevida variando de 2 a 3 meses, um teve sobrevida 5 meses e um de 12 meses.

Visto que foi obtida a sobrevida de apenas 10 cães, foi realizada uma comparação entre as médias de imunomarcção de COX-2 e macrófagos destes animais e a média de expressão dos mesmos anticorpos nos respectivos grupos experimentais, levando-se em consideração o desvio padrão para cada gradação histológica (Tabela 3). Verificou-se então que não houve diferença significativa entre eles e que esses 10 cães podem ser usados para a avaliação da sobrevida nos seus respectivos grupos experimentais.

Na comparação da média de sobrevida dos animais avaliados com suas respectivas médias em porcentagem de imunomarcção para COX-2,

observou-se que a expressão de COX-2 foi crescente, de acordo com o grau de malignidade e inversamente proporcional a sobrevida (Tabela 3).

Já a correlação obtida entre a média da sobrevida dos animais analisados com suas médias de expressão de macrófagos, evidenciou-se que a imunomarcagem de macrófagos e a sobrevida dos animais foi decrescente em relação à graduação histológica (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre a graduação histológica, sobrevida, expressão dos anticorpos COX-2 e MAC 387 dos animais em que foram avaliadas a sobrevida, expressão dos anticorpos COX-2 e MAC 387 nos grupos experimentais e seus respectivos desvios padrões. Jaboticabal, 2007.

Grau Histológico	Sobrevida (meses)	Expressão COX-2 (%) nos AAS	Expressão COX-2(%) nos GE e σ	Expressão MAC (%) nos AAS	Expressão MAC (%) nos GE e σ
I	29,25*	49,4	55,4 \pm 10,07	59,2	65,9 \pm 12,95
II	21	65,6	64,6 \pm 14,2	57,85	53,3 \pm 7,5
III	5,5	74	71,7 \pm 3,8	41	37,3 \pm 4,3

COX-2: Cicloxigenase-2

AAS: Animais que foram avaliadas a sobrevida

MAC: Macrófagos

GE: Grupos experimentais

σ : Desvio Padrão

* Até o momento

5. DISCUSSÃO

De acordo com Withrow (2007), o câncer representa uma das doenças mais graves dos animais domésticos e encontra-se entre as principais causas de morte. Na maioria das espécies, os processos neoplásicos envolvendo mastócitos são relativamente raros (COHEN et al., 1974). No entanto, em cães o mastocitoma representa um dos tumores mais comum na espécie (MACY, 1985; DE NARDI et al., 2002), representando 20% dos tumores caninos cutâneos (MACY, 1985).

Com relação à raça dos animais selecionados para este estudo, a maioria era mestiça (nove cães) ou da raça boxer (seis cães), seguidos da raça dachshund (três cães). Resultados semelhantes foram obtidos em estudo retrospectivo realizado por Furlani (2004) no mesmo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, que também relata que maior predisposição dos animais sem raça definida, seguidos pela raça boxer.

A maior incidência nos animais sem raça definida pode ser explicada pela predominância destes na casuística deste hospital. Deve-se ressaltar que se trata de um Hospital-escola, além de atender casos complexos, atende também pessoas de baixa renda, devido às isenções muitas vezes concedidas em aulas, como também ao programa de castração, um convênio entre a Faculdade e a Prefeitura do Município.

Em relação à incidência na raça boxer, os resultados corroboram aos achados de diversos autores que apontam para a maior predisposição ao desenvolvimento de mastocitoma nesta raça (FOX, 1998; HENDERSON &

BREWER, 1998; LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007). Crow (1977) e Furlani (2004) também encontraram o dachshund entre as raças mais acometidas.

Detectou-se a ocorrência de mastocitoma em cães de variadas idades, porém houve maior incidência em animais idosos, sendo a média de idade destes animais 8,5 anos, confirmando os achados de outros autores (FOX, 1998; HENDERSON & BREWER, 1998; LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007).

Quanto ao sexo dos animais, a incidência do mastocitoma em machos (14 cães) e em fêmeas (10 cães) não diferiu, corroborando com os relatos de Fox (1998), London & Seguin (2003) e Thamm & Vail (2007) que afirmaram não haver predisposição sexual nesta neoplasia.

Na avaliação da predisposição racial, etária, sexual e a gradação histológica realizada, não foi evidenciada nenhuma correlação estatisticamente significativa ($P < 0,05$), entretanto esses dados não são representativos, uma vez que se trata de uma amostra pequena, constituída apenas por 24 cães. É importante ressaltar que este estudo não corresponde a um estudo retrospectivo, pois alguns animais portadores de mastocitoma não foram selecionados por terem sido submetidos previamente a terapia antiinflamatória, o que poderia interferir nos resultados.

O exame histopatológico é o método de eleição para se identificar as características de uma neoplasia (MOTA & OLIVEIRA, 1999). De acordo com diversos autores, a gradação histopatológica do mastocitoma é considerada o fator mais importante no prognóstico e na avaliação do comportamento

biológico desta neoplasia (FOX, 1998; HENDERSON & BREWER, 1998; LONDON & SEGUIN, 2003; THAMM & VAIL, 2007). A classificação histológica dos mastocitomas deste estudo foi realizada de acordo com o grau de anaplasia celular, seguindo os critérios de Patnaik et al. (1984) e teve como objetivo avaliar o tipo de mastocitoma separá-los em grupos experimentais distintos.

A avaliação da expressão dos anticorpos poderá então auxiliar na gradação histológica do tumor, visando estabelecer o prognóstico baseado na expressão dos anticorpos COX-2 e MAC 387. Importante salientar que os tipos histológicos de mastocitoma podem sofrer alterações devido à subjetividade de alguns parâmetros estabelecidos, como por exemplo os de Bostock (1973) e Patnaik et al. (1984) na classificação histológica desta neoplasia. Esses parâmetros podem sofrer influência de critérios individuais do patologista, uma vez que diferentes patologistas podem classificar um mesmo tumor em diferentes graus histológicos. Existe uma forte tendência dos patologistas a utilizarem graus intermediários ou até mesmo grau III quando há dificuldade em estabelecer uma classificação (JÉROME et al., 1999), justificando a necessidade de exames complementares, como por exemplo, a imunohistoquímica.

A imunohistoquímica é um método auxiliar de diagnóstico de extrema importância, e está sendo cada vez mais utilizada na rotina diagnóstica. Isso se deve a necessidade de diagnósticos precisos para determinar o tratamento e prognóstico, principalmente das neoplasias. Trata-se de uma metodologia relativamente prática, fácil de ser realizada, e pode ser utilizada em tecidos

parafinados, congelados ou frescos (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 adotou-se rígidos controles positivos e negativos, métodos de recuperação antigênica e bloqueio de reações inespecíficas visando a obtenção de reações fidedignas.

Os resultados obtidos no presente estudo evidenciaram que os anticorpos monoclonais COX-2 (CX 294) e MAC (MAC 387) foram eficazes na detecção de cicloxigenase-2 e macrófagos em tecido cutâneo canino. Estes dados corroboram com os achados de Castro (2004) e De Nardi (2006) que utilizaram os mesmos anticorpos, e a mesma técnica de detecção. O que mostra que estes anticorpos podem ser utilizados perfeitamente em tecido canino, apesar de não serem espécie-específico.

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 e colaboradores (2007) obtiveram resultados semelhantes, pois relataram que a imunomarcção de COX-2 foi praticamente nula em tecido normal de vesícula urinária 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 em humanos e 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, 2006; 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 imunomarcção e a gradação histológica.

Ainda foi verificado que a expressão da cicloxigenase 2 se mostrou inversamente proporcional a sobrevida dos animais estudados, semelhante ao encontrado por De Nardi (2006) em neoplasias mamárias de cadelas e por Takatori e colaboradores (2007) em estudo realizado com carcinoma esofágico

de células escamosas em humanos, que ainda correlacionaram a esses achados o aumento da capacidade de invasão e metastáses.

Pode-se observar pelos resultados obtidos neste estudo que as neoplasias mais agressivas tiveram maior expressão de COX-2, porém mesmo nos mastocitomas classificados como grau I, onde houve menor expressão de COX-2, esta neoplasia apresentou elevada imunomarcação, com valores superiores a 55%.

Ação antitumoral dos inibidores de COX-2 tem sido descritas no câncer de bexiga, cólon e outros carcinomas em humanos (KAWAMORI et al., 1998; HENRY, 2003) e em carcinomas de células transicionais em cães (RODASKI & DE NARDI, 2006; KNAPP, 2007). Estes dados, juntamente com a alta expressão de COX-2 encontrada nos mastocitomas, mesmo nos tumores de menor grau de diferenciação, encorajam os médicos veterinários a empregarem terapias antiinflamatórias anti-COX-2 nos mastocitomas.

Vários estudos enfocam o envolvimento de macrófagos nas neoplasias, mas ainda não há um consenso sobre sua real função. Enquanto alguns autores demonstram que a infiltração de macrófagos em alguns tumores pode contribuir com a imunidade antitumoral, outros relatam exatamente o contrário. Os macrófagos podem prevenir o estabelecimento e dispersão de células tumorais, e simultaneamente, podem ter funções para estimular o crescimento e disseminação do tumor (BINGLE et al., 2002; SICA et al., 2002; MURDOCH et al., 2004).

Foi evidenciado aumento no número de macrófagos em mastocitoma cutâneo canino, quando comparado ao tecido cutâneo normal da mesma

espécie, sugerindo que os macrófagos são quimioatraídos para o ambiente tumoral. Tais achados corroboram com os resultados obtidos por Hemmerlein et al. (2000) e Sickert et al. (2005) que observaram aumento do número de macrófagos em tecido neoplásico de rim e cólon de humanos, respectivamente, quando comparado aos mesmos tecidos sem alterações patológicas.

Consoantes com os resultados obtidos neste trabalho estão os de Suzuki et al. (1995) em estudo realizado com carcinoma de cólon humano, que também verificaram o decréscimo do número de macrófagos de acordo com o grau de malignidade da neoplasia, sugerindo que a quimioatração de macrófagos para o ambiente tumoral decresce com a progressão neoplásica. Sickert e colaboradores (2005) também estudando câncer de cólon em humanos, obtiveram resultados similares e ainda relacionaram ao decréscimo do número de macrófagos, a inibição da apoptose de linfócitos e a redução da liberação de agentes citotóxicos, sugerindo assim, que há diminuição da resposta anti-tumoral em estágios avançados de câncer de cólon.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Kerr et al (1998) que estudaram carcinoma pulmonar de células não pequenas em humanos e encontraram uma correlação significativa e positiva entre a regressão tumoral e alta infiltração de macrófagos. Contrariamente, Koukourakis e colaboradores (1998) que ao estudarem a mesma neoplasia verificaram aumento da expressão de macrófagos em tumores mais agressivos, correlacionando esse aumento a um pior prognóstico.

Klimp et al (2001) contradizem os achados do presente trabalho, pois relataram em estudo realizado com neoplasias ovarianas em mulheres que a

expressão de macrófagos foi crescente conforme a graduação de malignidade do tumor.

A imunomarcção de macrófagos e a sobrevida dos animais portadores de mastocitoma foram decrescentes em relação à gradação histológica, ou seja, tumores menos agressivos (G1) apresentaram um maior número de macrófagos infiltrados (65,9%) em relação aos tumores mais agressivos e com pior prognóstico (G3), que mostraram aproximadamente 50% menos (37,3%).

Concordantes com esses resultados, estão os de Shimura et al. (2000) que sugeriram que o decréscimo de macrófagos, em relação à gradação histológica, pode ser considerado um fator prognóstico do câncer prostático de homens, fazendo ainda uma correlação positiva entre o número de macrófagos e a sobrevida dos pacientes e associação inversa à presença de linfonodos positivos para a doença. Esses autores observaram ainda diminuição do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e de óxido nítrico em tumores mais agressivos, sugerindo que o crescimento tumoral suprimiu a atividade citotóxica dos macrófagos e conseqüentemente reduz a expressão dessas moléculas. Entretanto, contradizendo esses achados, Lissbrant e colaboradores (2000) também ao estudar carcinoma prostático em homens, correlacionaram à alta expressão de macrófagos a baixa sobrevida.

De acordo com Bingle et al (2002) estas contradições nos estudos do mesmo tipo tumoral podem ser reflexo das diferenças no número, grau, estágio e tamanho do tumor, assim como o método utilizado em cada trabalho.

Diversos autores contradizem os achados do presente trabalho ao estudarem câncer de mama em mulheres, pois correlacionam à elevada

expressão de macrófago ao pior prognóstico (LEEK et al., 1996; GOEDE et al., 1999; LEEK et al., 2000), à tumores de alto grau de malignidade (LEE et al., 1997), à angiogênese e baixa sobrevida (LEEK et al., 2000).

Estudo realizado por Salvesen & Akslen (1999) com carcinoma endometrial de mulheres também contradiz o presente estudo, pois foi verificada alta infiltração de macrófagos nos tumores mais agressivos. Esses autores ainda correlacionaram a esses achados o aumento da angiogênese e a baixa sobrevida.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- ✓ Os anticorpos monoclonais anti-COX-2 (CX 294) e anti-macrófagos (MAC 387) reagem com tecidos caninos normais ou neoplásicos.
- ✓ Quanto maior a expressão de COX-2 nos mastocitomas caninos, pior o grau histológico e menor a sobrevida do paciente.
- ✓ Por sua vez, quanto maior a expressão de MAC 387 nos mastocitomas caninos, menor o grau histológico e maior a sobrevida do paciente.
- ✓ A imunomarcção com a COX-2 e com o MAC 387 em mastocitomas caninos pode ser empregada para estabelecer o prognóstico do paciente.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKER-GABB, M.; HUNT, G.B.; FRANCE, M.P. Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behavior and response to surgery. **Australian Veterinary Journal**, Sidney, v.81, p.732-738, 2003.

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

BEAM, S.L., RASSINICK, K.M.; MOORE, A.S.; MCDONOUGH, S.P. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. **Veterinary Pathology**, v.40, p.496-500, 2003.

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.

BINGLE, L.; BROWN, N.J.; LEWIS, E. The role of tumor-associated macrophages in the tumor progression: implications for a new anticancer therapies. **Journal of Pathology**, v.196, p.254-265, 2002.

BLANKENSTEIN, T.; QIN, Z.H.; UBERLA, K.; MULLER, W.; ROSEN, H.; VOLK, H.D.; DIAMANTSTEIN, T. Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer. **Journal of experimental medicine**. v. 173, n. 5, p. 1047-1052, 1991.

BOSTOCK, D.E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. **Journal Of Small Animal Practice**, v.14, p.27 – 40, 1973.

BOSTOCK D.E., et al., Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumors. **British Journal of Cancer**, v.59, p.915-8, 1989.

BREYER M. D. & HARYS C. H., Cyclooxygenase 2 and the kidney, **Current Opinion in Nephrology & Hypertension** v.10, p89-98, 2001.

BURLEIGH, M.E. Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. **Circulation**, v.105, n.53-60, p. 1816- 1823, 2002.

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.

CASTRO, M.B. Avaliação Histopatológica e Caracterização Imunoistoquímica das Células Monoclonais em Órgãos Linfóides e Lesões na Infecção Aguda Experimental por *Ehrlichia canis*. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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.

COHEN, D. et al. Epidemiological analysis of the most prevalent sites and types of canine neoplásica observed in a veterinary hospital. **Cancer Research**, v.34, p.2859-2868, 1974.

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

CROW,S.E. Treatment of a mast cell tumor in a dog. **Mod. Vet. Pract.** v.58, n. 9, p.766-767, 1977.

CURRY A., et al., Evidence for in vivo mitosis by granule-containing mast cells from canine mastocytomas. **Virchows Archiv.**, v.433, p.465-70, 1998.

DAVIES, N.M. Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the large intestine. **Disease of the Colon & Rectum**, Baltimore, v.38, p.1311 – 1321, 1995.

DEMPKE, W.; RIE, C.; GROTHEY, A.; SCHMOLL, H.J. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? **Cancer Research**, v.127, p.411 – 417, 2001.

DE NARDI, A.B. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, P53 e Caspase-3 no diagnóstico de neoplasias de mama em cadelas. 2006. 91p. Dissertação (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, S.; SOUZA, R.S.; MACEDO, T.R.; RODIGHIERI, S.M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C.H. **Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamento em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná**, Archives of Veterinary Science, v.7, n.2, p.15-26, 2002.

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

EBERHAT, 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.

FAN T.M., et al., Mast cell neoplasia in dogs. **Vet Med**, p.919-29, 2001.

FOX, L.E. Mast cell tumours. In: MORRISON, W.B. **Cancer in Dogs and Cats**. 1998 p.479 – 488.

FURLANI, J.M. Estudo Retrospectivo dos Casos de Mastocitoma Atendidos Junto ao Serviço de Oncologia da Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP/Campus Jaboticabal, no período de janeiro de 2001 a junho de 2004. 102p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

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.

GERRISTEN, R.J.; TESKE, E.; KRAUS, J.S.; RUTTEMAN, G.R. Multi-agent chemotherapy for mast cell tumours in the dog. **The Veterinary Quarterly**, v.20, n.1, p. 28-31, 1998.

GIARDIELLO, F. M.; OFFERHAUS, G. J. A.; DUBOIS, R. N. The role of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer prevention. **European Journal of Cancer**, v. 31, p. 1071-76, 1995.

GILSON, S.D.; STONE, E.A. Principles of oncology surgery. **The Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v.12, p.27-39, 1990.

GINN P.E., et al., Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. **Veterinary Pathology**, v.37, p.33-9, 2000.

GOEDE, V.; BROGELI, L.; ZICHE, M.; AUGUSTIN,H.G. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant proten-1. **International Journal Of Cancer**, v. 82, p.765-770, 1999.

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.

HEMMERLEIN, B.; SCHERBENING, J.; KUGLER, A.; RADZUN, H.J. Expression of VCAM-1, ICAM-1, E- and P-selectin and tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma. **Histopathology**, v.37, p.78-83, 2000.

HENDERSON, R. A.; BREWER JR, W.G. Pele e subcutâneo; In: SLATTER, D. **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**. 1998, v.2, p.2447 – 2462.

HENRY, C.J. Management of transitional cell carcinoma. **The veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, p. 597-613, 2003.

HOTTENDORF, G.H.; NIELSEN, S.W. Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. **Journal of Veterinary Pathology** v. 5, p. 102-121, 1968.

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.

IWATA N., et al., Canine extracutaneous mast-cell tumours consisting of connective tissue mast cells. **Journal of Comparative Pathology**., v.123, p.306-10, 2000.

JÉROME, J. et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. **JAVMA**, V.215, N.11, P.1629-1634, 1999.

KAWAMORI, T.; RAO, C. V.; SEIBERT, K.; Chemiopreventive activity of celecoxib against colon carcinogenesis. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 59, p. 605-610, 1998.

KERR, K.M.; JOHNSON, S.K.; KING, G.; KENNEDY, M.M.; JEFFREY, R. Partial regression in primary carcinoma of the lung: does it occur? **Histopathology**, v.33, p. 55-63, 1998.

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 humana ovarian tumors and tumor-associated macrophages. **Cancer Research**, v. 61, n.1, p.7305 – 7309, 2001.

KNAPP, D.W. Tumors of Urinary System. In: WITHROW, S.J., MAC EWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, p. 649-658, 2007.

KOUKOURAKIS, M.I.; GIATROMANOLAKI, A.; KAKOLYRIS, S. et al. Different patterns of stromal nad cancer cell thymidine phosphorylase reactivity in non-small

lung cancer: impact on tumour neo-angiogenesis and survival. **British Journal of Cancer**, v. 77, p. 1696-1703, 1998.

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.

LAVALLE, G.E.; ARAÚJO,R.B.; CARNEIRO, R.A. Tratamento clínico e cirúrgico de mastocitoma em cães. **A Hora Veterinária**, v. 23, n.138, p.21-28, 2004.

LEE, A.H.S.; HAPPERFIELD, L.C.; BORBROW, L.G.; MILLIS,R.R. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. **Journal Of Clinical Pathology**, v. 50, p.669-673, 1997.

LEEK, R.D.; HUNT, N.C.; LANDER, R.J.; LEWIS,C.E.; ROYDS, J.A. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in the breast cancer. **Journal of Pathology**, v.190, p.430-436, 2000.

LEEK, R.D.; LEWIS, C.E.; WHITEHOUSE, R.; GREENALL, M.; CLARKE, J.; HARRIS, A.L.; Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Research**, v.50, p.4625-4629, 1996.

LISSBRANT, I.F.; STATTIN, P.; WIKSTROM, P.; DAMBER, J.E.; EGEVAD, L.; BERG, A. Tumour associated macrophages in human prostate cancer: relation clinicopathological variables and survival. **International Journal Of Clinical Oncology**, v.17, p.445-451, 2000.

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.

LONDON, C.A.; SEGUIN, B. Mast cell tumors in the dog. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.33, n.3, p. 473-489, 2003.

MACY, D.W. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.15, n.4, p. 783-803, 1985.

MADEWELL, B.R.; THIEILEN, G.H. Mast cell and melanocytic neoplasms. In: THULEN G.H., MADEWELL, B.R (Ed.) **Veterinary cancer medicine**, Philadelphia: Lea & Fibiger, 1987, p.310-325.

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.

McBRIDE, W.H. Phenotype and functions of intratumoral macrophages. **Biochim Biophys Acta**, v.865, p.27-41, 1986.

MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. **Patologia Processos Gerais**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 320p.

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.

MURDOCH, C.; GIANNOUDIS, A.; LEWIS, C.E. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxia areas of tumors and other ischemic tissues. **Blood**, v. 104, n. 8, p. 2224- 2234, 2004.

MURPHY, S.; SPARKERS,A.H.; SMITH, K.S.; BLUNDEN, A.S.; BREARLEY, M.J. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumours in dogs, their survival and efficacy of surgical resection; **The Veterinary Records**, v.154, p.743-746, 2004.

MURRAY, M. D.; BRATER, D. C. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Annual Review Pharmacology & Toxicology**, Philadelphia, v. 32, p. 435-467, 1993.

MIYASHITA et al. 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.

NIJSTEN, T.; COLPAERT, C.G.; VERMEULEN, P. B.; HARRIS, A.L.; VAN MARCK, E.; LAMBERT, J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. **The British Journal of Dermatology**, v.151, p.837-845, 2004.

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.

O'KEEFE, D.A. Canine mast cell tumors. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.20, n.4, p.1105-15, 1990.

PATNAIK, A.; EHLER, W.; MACEWEN, E. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival times in 83 dogs; **Veterinary Pathology**, v.21, p.469– 474, 1984.

POLLACK, M.J.; FLANDERS, J.A.; JOHNSON, R.C. Disseminated malignant mastocytoma in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.27, 1991.

RECH, R R, et al., Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 56, nº 4, p.441-8, 2004.

RODASKI, S.; DE NARDI, A.B. Classificação dos Quimioterápicos. In: RODASKI, S.; DE NARDI, A.B. **Quimioterapia Antineoplásica em Cães e Gatos**, p. 31-159, 2006.

ROGERS, K.S. Dilemmas of diagnosis and treatment. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v.26, p.87-192, 1996.

ROSS, J.A. The biology of the macrophage; In: BURKE, B.; LEWIS, C.E. **The Macrophage**. Oxford, United Kingdom: Oxford University Press, p. 1 – 72, 2002.

SALVESEN, H.B.; AKSLEN, L.A. Significance of tumor-associated macrophage, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. **Int J Cancer**, v.84, p.539-543, 1999.

SCOTT, R.J. et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **Journal of Pathology**, v.165, p.173-178, 1991.

SEGUIN, B. et al. Clinical outcome of dogs with grade II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999) **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.218, p.1120 – 1123, 2001.

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.

SHIMURA,S.; YANG,G.; EBARA S.; WHEELER, T.M.; FROLOV, A.; THOMPSON, T.C. Reduced infiltration of tumour-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression **Cancer Research**, v.60, p.5857 – 5861, 2000.

SICA, A.; SACCANI,A.; MANTOVANI,A. Tumor-associated macrophage: a molecular perspective. **International Immunopharmacology**, v.2, p.1045-1054, 2002.

SICKER, D.; AUST, D.E.; LANGER, S.; HAUPT, I.; BARETTON, G.B.; DIETER, P. Characterization of macrophage subpopulation in colon cancer using tissue microarrays. **Histopathology**, v.46, p. 515 – 521, 2005.

SIMPSON, A.M.; LUDWIG, L.L.; NEWMAN, S.J.; BERGMAN, P.J.; HOTTINGER, H.A.; PATNAIK, A.K. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumours in dogs; **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p. 236-240, 2004.

SLAUSON & COOPER, B.J. **Mechanisms of Disease**. 3^a ed. Missouri: Gosby, 2002. 445p.

SMALLEY, W.E.; DUBOIS, R.N. Colorectal cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Advances in Pharmacology**, v. 39, p. 1-20, 1997.

SOUZA, C.H.M., et al., Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) and Cancer: Chemoprevention and treatment. **Veterinary Cancer Society Newsletter**, p.8-11, 2000.

SUBBARAMAIAH, K; TELANG, N.; RAMONETTI, J. T.; ARAKI, R.; DEVITO, B.; WEKSLER, B. B.; DANNENBERG, A.J. Transcription of cyclooxygenase-2 is enhanced in transformed mammary epithelial cells. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 54, p. 4424-4429, 1996.

SUEIRO, F.A.R.; DALECK, C.R.; ALESSI, A.C. Ultra-estrutura dos mastócitos de diferentes tipos histológicos de mastocitoma canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, p. 255-258, 2002.

SUZUKI, Y.; OHTANI H.; MIZOI, T. Cell adhesion molecule expression by vascular endothelial cells as an immune/inflammatory reaction in human colon carcinoma. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 86, p. 585-593, 1995.

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.

TARDY S., et al., Canine mast cell tumor: clinical Therapeutic and comparative features. **Veterinaria**, v.6, p.61-77, 1992.

TASAKA, A.C. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. Anti-inflamatórios Não Esteroidais. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, p. 212 a 226, 1999.

THAMM, D.H.; MAULDIN, E.A.; VAIL, D.M. Prednisone and Vinblastine Chemoterapy for Canine Mast Cell Tumors – 41 Cases (1992-1997). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.13, p.491-497, 1999.

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.

TORTELLY R., CARVALHO E.C.Q. e SICILIANO A.V. Mastocitoma canino: aplicação do escore de Patinak et al.. para o diagnóstico/prognóstico de rotina. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v.7, p.159-61, 2000.

TSUJII M, & DUBOIS R., Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. **Cell**, v.83, p.493-501, 1995.

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.

VIRCHOW, R. Aetologie der neoplastischen. In: GESCHWULSTE, **Pathogenie der neoplastischen**. Berlin, Verlag von August Hirschwald, p.57-101, 1863.

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.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J.E. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.9, p. 3250-3256, 2005.

WEISSE, C.; SHOFER, F.S.; SORENMO,K.; Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. **Journal of the American Hospital Association**, v.38,p.71-73, 2002.

WITHROW, S. J. Whi Worry About Cancer in Pet Animals? In: WITHROW, S.J., MAC EWEN, E.G. **Small Animal Clinical Oncology**, p. xv – xvii, 2007.

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

YAMASHIRO, S.; TAKEDA, M.; NISHI, T. Tumor-derived monocyte chemoattractant protein – 1 induces intratumoral infiltration of monocyte- derived macrophage subpopulation in transplanted rat tumors. **American Journal Pathology**. V. 145, p. 856-867, 1994.