

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

IMUNOMARCAÇÃO DE COX 2, PGE-2, VEGF E CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

CELMIRA CALDERÓN

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho”, Campus Botucatu, para
obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Botucatu, SP
Setembro, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Calderon, Celmira.

Imunomarcção de COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3 em mastocitomas
cutâneos caninos / Celmira Calderon. – 2008.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu,
Universidade Estadual Paulista, 2008.

Orientador: Prof^a. Ass. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Assunto CAPES: 50500007

1. Medicina veterinária. 2. Patologia veterinária. 3. Cão.

CDD 636.08960756

Palavras-chave: Caspase; COX-2; Mastocitoma; PGE2; VEGF.

CELMIRA CALDERÓN

IMUNOMARCAÇÃO DE COX 2, PGE-2, VEGF E CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS

Banca examinadora:

Profa. Ass. Dr^a. Renée Laufer Amorim

Prof. Ass. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Profa. Ass. Dr^a. Noeme Sousa Rocha

Profa. Ass. Dr^a. Mirella Tinucci Costa

Profa. Dr^a. Sara Maria de Carvalho e Suzano

Botucatu, 05 de setembro de 2008.

Dedico

A minha mãe por seu apoio, alegria, carinho e amor. Sua educação formou meu caráter, sem sua orientação com certeza eu não sobreviveria no mundo.

Ao meu pai pelo amor e principalmente por que nas horas difíceis me ensinou a ter garra e nunca desistir.

Ao meu irmão... Porque crescer ao seu lado foi uma experiência única

A minha tia Salete e aos meus avós Yolanda e Antonio, pelo carinho e amor ilimitados.

*A minha abuelita Elza, pois mesmo distante foi sempre presente em minha vida
(in memoriam)*

Agradeço

*A minha orientadora Renée Laufer Amorim por ter me ensinado e crescer
como pessoa e profissional.*

AGRADECIMENTOS:

Primeiramente a Deus, por que esteve sempre presente em minha vida como Pai amoroso. Tenho certeza da sua presença durante as viagens necessárias para estar presente nas aulas de pós-graduação, nas horas de saúde e doença, nas dificuldades em conciliar família, trabalho e os sonhos da pós-graduação, tenho certeza que Ele sempre me auxiliou em cada momento da minha vida, e se hoje estou aqui agradeço a Ele.

Aos Professores que fizeram parte da minha formação como patologista e como ser humano, Dr. Julio Lopes Sequeira, Dra. Noeme Sousa Rocha e Dr. Enio Pedone Bandarra muitas vezes só ouvi-los falar durante uma conversa na sala, copa ou corredor foi um aprendizado de valor inestimável, vocês precisam saber do orgulho que tenho de tê-los como exemplos.

A Universidade Estadual do Norte do Paraná, por permitir a realização da pós-graduação.

Aos Residentes e também amigos da Patologia: Arita, Didier, Fred, Anita e Ticiane, pelas horas de trabalho sempre com muita descontração.

Aos amigos pós-graduandos Fábio, Caio, Luciano, Edna, Giu, Rafael, Leandro, Marcela, Isabelle, Guilherme e Ana Paula, pelos momentos de apoio e conversas alegres.

Aos amigos Giovana W. Di Santis e Pedro Pinczowski, pelos momentos de ajuda, risadas e principalmente pela amizade! Conviver com vocês foi aprender a ver que tristeza é só para quem quer ser triste!

À amiga Sandra Bassani Silva, foram anos de amizade, confidências e apoio nas horas difíceis.

À Camila Dias Porto, porque nas horas difíceis descobrimos quem são nossos verdadeiros amigos.

Ao Maury Raul e Noel, porque a gente só explica “o porquê do bom dia” para pessoas queridas. Vocês trazem alegria e fazem as coisas darem certo, aprendi muito com vocês nesses anos de convivência.

Aos funcionários da Pós-Graduação por toda ajuda, facilitando todo o andamento do doutorado.

A minha família paranaense, Mariza Fordellone Rosa Cruz, Roberto Rosa Cruz e filhos Mariana, Carol e Gabriel, minha família do coração, vocês fazem meus dias cheios de alegria, amor e carinho, sem vocês Bandeirantes não seria uma feliz Bandeirantes.

Aos amigos e amores que são mais uma família que tenho no coração... Vocês são minhas alegrias, meu porto seguro... Vanessa Caetano, Ana Paula e Mario B. G. Dourado, Paula Sakurai, Fernanda Strohm, Laura Guedes, Shellida Fernanda e atualmente Guilherme Andraus.

Ao meu padrasto José Luiz Sato, porque além do apoio físico, psicológico e carinho. Sua sabedoria nos gestos e palavras me dá muito orgulho da oportunidade tê-lo como minha família.

Aos meus primos mais que queridos Vanessa Valezi Grandi e Bruno Giorno por me acolherem, pela amizade, pelas filosofias, pelos desabaços, por tantos momentos de alegria.... Só posso dizer que vocês têm no meu coração um lugar muito especial!!

A Cristiana M. Freire pela amizade, bom humor, bons conselhos e imensa ajuda na elaboração e avaliação estatística na reta final.

A Brisa e Dido por serem companheiros fiéis de todas as horas.

Enfim...

Agradeço a amizade que, gentilmente, vocês me permitiram desfrutar.

Agradeço a energia que, positivamente, muitas batalhas vocês me ajudaram a ganhar.

Agradeço a força que, bravamente, vocês conseguiram me emprestar.

Agradeço a bondade do coração de todos, pelo carinho que puderam me dar...

Ao fim de mais uma etapa ...

Obrigada!!

CALDERÓN, C. Imunomarcacão de COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3 nos mastocitomas cutâneos caninos. Botucatu, 2008, 84 p., Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O mastocitoma canino (MCT) é uma neoplasia maligna de grande importância na clínica oncológica devido ao seu comportamento biológico agressivo e alta frequência. A COX-2 e a PGE2 têm sido associadas à promoção e progressão tumoral e seus principais mecanismos envolvem estímulos da angiogênese tumoral e a inibição da morte celular programada. O VEGF é um potente indutor da angiogênese e a caspase-3 tem um importante papel na via efetora da apoptose. Compreender o mecanismo pela qual a COX-2 pode estimular a progressão tumoral no mastocitoma, permite ampliar o conhecimento do comportamento biológico desta neoplasia e direcionar tratamentos mais eficazes. O presente trabalho fez um estudo retrospectivo em 24 casos de mastocitoma canino (MCT). As neoplasias foram classificadas de acordo com Patnaik *et al.* (1984) e a expressão da COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3 foram avaliadas usando a técnica de imunoistoquímica. A expressão da COX-2 foi correlacionada à expressão do VEGF, PGE2 e caspase-3 nos diferentes graus histopatológicos. A imunomarcacão da caspase-3 foi menor nos tumores indiferenciados comparados com os bem diferenciados. Comparando os dados da expressão da COX-2 com os demais marcadores foi observado a correlação positiva entre COX-2 e PGE2, COX-2 e VEGF nas graduações II e III. A correlação entre COX-2 e caspase-3 foi somente detectada no grau III.

Palavras-chave: COX-2, PGE2, VEGF, caspase-3, mastocitoma.

CALDERÓN, C. Immunolabeling of COX-2, PGE2, VEGF and caspase-3 in canine cutaneous mast cell tumors. Botucatu, 2008, 84 p., Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The canine mast cell tumor (MCT) is a malignant neoplasia with great importance on the clinical practice due to its aggressive behavior and high frequency. The COX-2 and the PGE2 have been associated to the tumor initiation, promotion and progression, and its main mechanisms involve the stimuli of tumor angiogenesis and the inhibition of apoptosis. The VEGF is a powerful inductor of angiogenesis and the caspase-3 is responsible for most part of the apoptotic effects. The understanding of the mechanism by which the COX-2 stimulates the tumor progression in the mast tumor cells provides an extension through the biological behavior of this neoplasia and leads to a better and effective treatment. The present work was a retrospective study in 24 cases of MCT. The neoplasias were classified according to Patnaik et al. (1984) and the expression of COX-2, PGE2, VEGF and caspase-3 were evaluated using the immunohistochemistry technique. The expression of COX-2 was correlated to the expression of VEGF, PGE2 and caspase-3 in the different histopathologic grades. Caspase-3 immunolabeling was lower in the undifferentiated tumors compared to the more differentiated ones. Comparing the COX-2 expression data to the other markers it was observed a positive correlation between COX-2 and PGE2, COX-2 and VEGF in grade II and III. Correlation between COX-2 and caspase-3 was detected only on grade III.

Keywords: COX-2, PGE2, VEGF, caspase-3, mast cell tumor.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Relação dos anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, clone, marca e diluições padronizadas, utilizadas nos cortes histopatológicos dos casos de mastocitoma cutâneo canino, no período de 2004 a 2007. FMVZ - UNESP – Botucatu, SP.....	27
TABELA 2: Escore (PCM) atribuído a lâmina referente ao percentual de células neoplásicas marcadas em todo o corte histopatológico, nos casos de mastocitoma cutâneo canino (Forma adaptada de De Nardi, 2007).....	28
TABELA 03: Medianas do percentual de células com marcação citoplasmática para o anticorpo primário anti-caspase-3, nos três graus de mastocitoma.....	38
TABELA 4: Medianas dos escores de marcação citoplasmática de caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino.....	39
TABELA 05: Medianas do percentual de células marcadas para o anticorpo primário anti-COX-2 nos três graus do MCT.....	43
TABELA 6: Medianas dos escores da expressão da COX-2 nos diferentes graus histopatológicos.....	44
TABELA 7: Correlação entre os escores da imunomarcação de COX-2 com a caspase-3.....	47
TABELA 8: Interação dos escores da expressão da PGE2 frente aos diferentes graus histopatológicos.....	52
TABELA 9: Análise estatística da correlação entre os escores da imunomarcação de COX-2 com PGE2.....	54
TABELA 10: Mediana dos escores da imunomarcação de VEGF nos três diferentes graus do mastocitoma canino.	58

TABELA 11: Correlação entre os escores da imunomarcacão de COX-2 com VEGF, nos mastocitomas cutâneos canino.....	59
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Método para avaliar o percentual de imunomarcacão das células neoplásicas em todo o corte histopatológico, nos mastocitomas caninos do período de 2004 a 2007. FMVZ - UNESP – Botucatu, SP (Forma adaptada de De Nardi, 2007).....	28
FIGURA 2: Distribuição do percentual do número de animais acometidos por mastocitoma, com raça e sem raça definida, durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu, (n=24).....	30
FIGURA 3: Distribuição das raças dos cães acometidos por mastocitoma cutâneo canino (n=21), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.....	31
FIGURA 4: Porcentagem de animais do sexo feminino e masculino acometidos por mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....	32
FIGURA 5: Distribuição de cães de acordo com a idade dos animais que desenvolveram mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.....	33
FIGURA 6: Distribuição dos mastocitomas cutâneos caninos, de acordo com a graduação histopatológica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.....	35
FIGURA 7: Corte histológico de um mastocitoma grau I: Presença de grande quantidade de eosinófilos e mastócitos neoplásicos com granulação intracitoplasmática evidente (H.E., Obj 40X)	35

FIGURA 8: Mastocitoma grau II, celularidade moderada, células redondas a ovóides, anisocitose moderada, citoplasma apresenta pouca granulação e presença de mitose (seta), (H.E.,Obj 40X)36

FIGURA 9: Mastocitoma grau III, alta celularidade, anisocitose, anisocariose, pleomorfismo, nucléolos evidentes únicos ou múltiplos e célula multinucleada (seta) e mitose atípica (*) (H.E.Obj 40X).....36

FIGURA 10: Mastocitoma grau III. Imunomarcação citoplasmática positiva para caspase-3 em mastócitos neoplásicos (Imunoistoquímica, caspase-3, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125).....40

FIGURA 11: Índice apoptótico obtido pelo percentual de células com marcação citoplasmática para caspase-3 nos três graus do mastocitoma cutâneo canino, pela técnica de imunoistoquímica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.....40

FIGURA 12: Mastocitoma canino grau I. Imunomarcação citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125).....41

FIGURA 13:Mastocitoma canino grau II. Imunomarcação citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125).....42

FIGURA 14:Mastocitoma canino grau III. Imunomarcação citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125).....42

FIGURA 15: Percentual de células com marcação citoplasmática para COX-2 nos três graus do mastocitoma cutâneo canino, pela técnica de imunoistoquímica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.....43

FIGURA 16: Percentual referente à contagem numérica de COX-2 e caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....49

FIGURA 17: Escore referente à contagem numérica de COX-2 e caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....49

FIGURA 18: Mastocitoma Grau I. Imunomarcacão positiva para PGE2, PCM=0. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 40x).....50

FIGURA 19: Mastocitoma Grau II. Imunomarcacão positiva para PGE2, PCM=4. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 20x).....50

FIGURA 20: Mastocitoma Grau III. Imunomarcacão para PGE2, PCM=2. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 20x).....51

FIGURA 21: Correlacão dos escores de percentual de marcacão (PCM) entre COX-2 e PGE2. Durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....54

FIGURA 22: Mastocitoma Grau I. Imunomarcacão positiva para VEGF, PCM=4. Marcacão em mastócitos (*) e endotélio (seta) (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 40x).....56

FIGURA 23: Mastocitoma Grau II, PCM=4 (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 20x).....57

FIGURA 24: Mastocitoma Grau III, PCM=4 (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloracão Hematoxilina de Harris, Obj 40x).57

FIGURA 25: Correlação do percentual de marcação (PCM) entre COX-2 e VEGF. Durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....59

FIGURA 26: Distribuição da expressão do percentual de marcação (PCM) de COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3. Durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.....61

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1.	Mastocitoma Canino	19
2.2.	Ciclooxigenase e Prostaglandina E2	21
2.3.	Apoptose e a COX-2.....	24
2.4.	Angiogênese e a COX-2	26
3.	OBJETIVOS	30
4.	MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1.	Seleção das amostras e análise histopatológica	31
4.2.	Imunoistoquímica	31
4.3.	Avaliação da marcação	33
4.4.	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1.	Estudo retrospectivo	36
5.2.	Análise histopatológica.....	39
5.3.	Análise imunoistoquímica	43
5.3.1.	Avaliação da expressão da caspase-3	43
5.3.2.	Avaliação da expressão da ciclooxigenase-2.....	47
5.3.3.	Correlação da expressão da COX-2 e caspase-3	52
5.3.4.	Avaliação da expressão de PGE2	56
5.3.5.	Correlação da expressão da COX-2 e PGE2	59
5.3.6.	Avaliação da expressão de VEGF	61
5.3.7.	Correlação da expressão da COX-2 e VEGF.....	64
5.3.8.	Correlação da expressão da COX-2 , PGE2, VEGF e caspase-3.	67
6.	CONCLUSÃO	69
7.	REFERÊNCIAS ¹	71

IMUNOMARCAÇÃO DE COX 2, PGE-2, VEGF E CASPASE 3 EM MASTOCITOMAS CUTÂNEOS CANINOS.

1. INTRODUÇÃO

O mastocitoma canino (MCT) é a neoplasia maligna, de grande importância na prática clínica, devido ao seu comportamento biológico agressivo e freqüentes recidivas após cirurgias. Originada de mastócitos, esta neoplasia apresenta alta freqüência e corresponde a de 11 a 27% dos tumores malignos da pele do cão. Os cães acometidos por mastocitomas indiferenciados costumam apresentar alta mortalidade (LONDON e SEGUIM, 2003; THAMM e VAIL, 2007).

Apesar dos estudos atualmente desenvolvidos sobre mastocitoma, novos tratamentos ainda são necessários; para isso é importante obter informações sobre o comportamento biológico dessa neoplasia e dados que complementem a terapia já utilizada, resultando, portanto, no aumento da qualidade de vida e da sobrevida desses animais (SAKAI et al., 2002).

Maior compreensão da biologia molecular dos tumores é necessária para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, prognóstico e abordagens terapêuticas (EIBL et al., 2003).

A Cicloxigenase (COX), sinônimo para prostaglandina H sintetase, é uma enzima bifuncional que catalisa a ciclo-oxigenação e peroxidação do ácido araquidônico, derivado da membrana celular para a conversão em prostaglandinas (PGs) (DUBOIS et al., 1998; EIBL et al., 2003).

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima indetectável na maioria dos tecidos, mas pode ser induzida por sinais pró-inflamatórios, além de estar relacionada a eventos fisiológicos do desenvolvimento celular e processos cicatriciais (BAKHLE, 2001).

O desenvolvimento tumoral tem sido considerado uma consequência das múltiplas ações da superexpressão de COX-2 e suas propriedades de iniciação, promoção e progressão tumoral que, atuam nas células neoplásicas através da potencialização dos danos de DNA por radicais livres, inibição da apoptose, rompimento das barreiras teciduais, diminuição da adesão celular,

aumento da capacidade de invasão, promoção da angiogênese, metástase, modulação da inflamação e diminuição da resposta imune (TSUJII e DUBOIS, 1995; LIU e ROSE, 1996; TSUJII et al., 1997; MURATA et al., 1999; SOUZA et al., 2000; KUKARNI et al., 2001; ; ZHA et al., 2001; BOL et al., 2002; CAO e PRESCOTT, 2002; DONG et al., 2003; WANG e DUBOIS, 2004; HAYES, 2007).

Estudos avaliando a expressão de COX-2 em neoplasias caninas permitiram observar que tumores com menor diferenciação histopatológica ou com comportamento biológico mais agressivo apresentaram uma expressão de COX-2 maior que tumores mais diferenciados ou de melhor prognóstico. Esses dados vêm corroborar a hipótese da ação da COX-2 na progressão tumoral e no desencadeamento de um pior prognóstico para o paciente (DORÉ et al., 2003; MOHAMED et al., 2004; CALDERÓN, 2005; HELLER et al., 2005; BERSANO, 2006; DE NARDI et al., 2007).

A PGE2 é um dos metabólitos do ácido araquidônico produzido pelas COX-1 e COX-2 (MASFERRER et al., 2000), e muitos estudos têm demonstrado grande interesse na descoberta de uma possível ligação entre a COX-2 e a PGE2, no mecanismo do desenvolvimento e progressão do câncer (LUPULESCU et al., 1996; ARA et al., 1996).

Relatos na literatura oncológica identificando a expressão da COX-2 e a resposta ao uso com inibidores da COX (COXIBs) em processos neoplásicos têm gerado resultados encorajadores e significantes efeitos em reduzir ou inibir a incidência e a progressão de tumores em modelos animais e no tratamento de pacientes com câncer (KAWAMORI et al., 1998; KHAN et al., 2000; WILLIAMS et al., 2000; KHAN et al., 2001; MOHAMMED et al., 2001; KNAPP et al., 2000; HENRY, 2003; KELLY et al., 2003). Essa proposta oferece uma base científica para uma bem sucedida prevenção do câncer e uma real perspectiva do uso de drogas no tratamento da doença diagnosticada, sem os efeitos colaterais freqüentemente associados com a quimioterapia convencional (BAKHLE, 2001).

Dentre os mecanismos da COX-2, a diminuição da morte celular programada em células neoplásicas tem se destacado como uma das principais atuações na progressão tumoral. A inibição da apoptose prolonga o tempo de vida de células anormais, permitindo assim maior tempo para a

acumulação de múltiplas mutações genéticas que resultam em transformações fenotípicas e promoção do crescimento celular (BOL et al., 2002; CAO e PRESCOTT, 2002; KALTHOFF, 2003; EIBL et al., 2003; HONG-PING et al., 2005).

O conhecimento sobre as complexas vias da apoptose auxiliou no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, devido a sua correlação com o sucesso da terapia antineoplásicos, além de seu importante papel na patogênese tumoral e comportamento biológico das neoplasias (KALTHOFF, 2003).

Um dos mecanismos propostos para a ação da COX-2 na inibição da apoptose é o aumento na concentração intracelular de ácido araquidônico, que levaria à ativação da caspase-3 e a transição da permeabilidade mitocondrial, modulando a morte celular programada (CAO e PRESCOTT, 2002).

A caspase-3, em particular, tem um papel crucial na via efetora da apoptose. Estudar sua presença nas neoplasias tem grande importância no controle da recorrência tumoral, desenvolvimento e tratamento de eleição (MAO et al., 2008).

Como a falha na apoptose é um evento de grande importância na progressão e resistência a terapia citotóxica dos antineoplásicos e principal mecanismo dos COXIBs, avanços na compreensão dos eventos moleculares da apoptose demonstram que o uso dos inibidores seletivos para COX-2 ativam as caspases pela via intrínseca, através da liberação do citocromo C proveniente da mitocôndria celular (SUN et al., 2002; LIU et al., 2005; FERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2006; TESEI et al., 2007).

Um dos mecanismos que têm sido sugeridos para explicar como o aumento de COX-2 e seus metabólitos (PGs) podem contribuir na carcinogênese é pelo estímulo da angiogênese tumoral e, recentemente, os estudos têm se direcionado a um mecanismo que liga a superexpressão da COX-2 ao aumento dos fatores de crescimento vascular (HAYES, 2007).

Apesar de muitos fatores angiogênicos causarem angiogênese tumoral, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é o mais estudado, pois ele induz à proliferação, diferenciação e migração das células endoteliais, aumenta a permeabilidade capilar e prolonga o tempo de vida das neovascularizações, produz também collagenases que facilita para a célula

neoplásica o adentramento na circulação sanguínea pela perda da coesão celular (MOSCATELLI et al., 1981; RANIERI et al., 2001; ADDISON et al., 2005).

O aumento da síntese de VEGF é considerado uma das primeiras influências para a angiogênese, contribuindo assim para o desenvolvimento de características malignas, como crescimento acelerado e metástases (DE JONG et al., 1998).

O uso de inibidores da angiogênese tumoral é atualmente um grande alvo na terapia contra o câncer. Mais de 150 componentes antiangiogênicos têm sido desenvolvidos, sendo a maioria associada ao VEGF e seus receptores, portanto determinar a expressão do VEGF nas neoplasias pode ser extremamente útil como fator prognóstico ou orientação terapêutica (PANAYIOTIS et al., 2005).

Na prática oncológica, o estudo que aumente a compreensão dos mecanismos no mastocitoma canino da COX-2, PGE2, caspase-3 e VEGF, além de suas interações, trará melhores orientações na busca de um tratamento mais adequado como estratégia preventiva e terapêutica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Mastocitoma Canino*

O mastocitoma canino (MCT) é a neoplasia maligna, de grande importância na prática clínica. Originada de mastócitos, essa neoplasia apresenta alta frequência e corresponde a de 11 a 27% dos tumores malignos da pele do cão (THAMM e VAIL, 2007).

O MCT ocorre mais frequentemente em cães com média de 8,5 a 9,5 anos. Raças braquiocefálicas, como cães da raça boxer, costumam apresentar predisposição a desenvolver essa neoplasia. Não é relatada nenhuma predisposição sexual (BOSTOCK et al., 1989; O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000).

Em cães, o mastocitoma pode ocorrer em todo o corpo, na forma de nódulo solitário ou múltiplo. Quando cutâneo, essa neoplasia se apresenta com maior frequência nos membros pélvicos (24,6%), no abdômen (17,2%), tórax (14,7%), membros torácicos (13,6%) e cabeça (9,8%), entretanto ele pode se desenvolver na forma primária em vísceras, como baço, fígado e rins (O'KEEFE, 1990; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000).

Macroscopicamente variável e de difícil distinção de outros tumores de pele, o mastocitoma costuma se apresentar como uma massa pequena (aproximadamente 3,0 cm), firme, bem circunscrita, que pode ser eritematosa, alopecica e ulcerada, menos comumente pode se apresentar como uma massa pouco definida, macia e, algumas vezes, não aderida, podendo ser confundido com abscesso ou lipoma (FOX, 1998).

Os sinais clínicos observados refletem a extensão do envolvimento sistêmico e a presença ou ausência das síndromes paraneoplásicas atribuídas a degranulação dos mastócitos devido à presença de potentes mediadores químicos intracelulares como, histamina, heparina e fator quimiotático para eosinófilos e prostaglandinas. A histamina pode estimular os receptores gástricos H₂, resultando em uma excessiva secreção ácida e hipermotilidade, podendo levar à formação de úlceras gástricas e duodenais. Clinicamente o animal pode apresentar sinais de anorexia, vômito, diarreia, melena e anemia

(O'KEEFE, 1990; TARDY et al., 1992; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000; FAN et al., 2001).

O diagnóstico preciso é importante para escolha apropriada do tratamento e determinação do prognóstico. Para que o diagnóstico seja eficiente, é necessário que se faça uma boa anamnese, exame clínico, exame citológico e exame histopatológico da massa, assim como exames por imagem, nos casos de suspeita de neoplasias viscerais (TARDY et al., 1992; ROGERS, 1996; TAKAHASHI et al., 1997; RECH et al., 2004).

O mastocitoma é uma neoplasia que deve ser sempre considerada uma neoplasia maligna e de alto potencial metastático, por isso existe a necessidade de estudos que auxiliem na compreensão de seu comportamento biológico e tratamentos mais direcionados e eficazes (BOSTOCK et al., 1989; SIMÕES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; LEIBMAN et al., 2000; SAKAI et al., 2002; LONDON e SEGUIN, 2003).

A graduação histopatológica ainda parece ser o fator mais importante no auxílio da determinação do prognóstico. Essa técnica tem sido muito utilizada também por sua facilidade ao ser realizada na lâmina utilizada para o diagnóstico (LONDON e SEGUIN, 2003).

Desde 1973, Bostock, baseado em Hottendorf e Nielsen (1967), desenvolveu uma graduação histopatológica para o mastocitoma e realizou um estudo, comparando a sobrevida (30 semanas) com a graduação em 114 animais que desenvolveram o mastocitoma e que realizaram tratamento com remoção cirúrgica. A graduação descrita por Bostock é dividida em grau I, II e III, onde o grau I é a neoplasia menos diferenciada e o grau III a mais diferenciada, os critérios utilizados foram número de figuras de mitose, grau de pleomorfismo celular, evidenciação dos grânulos citoplasmáticos e a diferença entre o raio do núcleo e o diâmetro celular total. Não foi utilizada a correlação entre a presença de eosinófilos nos diferentes graus.

Em 1984, Patnaik et al., considerando as variações histopatológicas e o comportamento biológico do mastocitoma, criaram um escore e propuseram sua adoção, correlacionando-a à sobrevida observada por 1500 dias. Os mastocitomas foram classificados em grau I ou bem diferenciados, grau II ou moderadamente diferenciados e grau III ou anaplásicos / indiferenciados. Os critérios utilizados para diferenciar os níveis de malignidade incluem: extensão

do acometimento da pele, celularidade e morfologia celular, índice mitótico e reação estromal.

Provavelmente, devido a um maior período de acompanhamento da sobrevida dos animais (1500 dias) e a facilidade da não necessidade de mensuração do raio nuclear para determinar a graduação do mastocitoma, a graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984) tornou-se a graduação mais usada para o mastocitoma canino (O'KEEFE, 1990; TARDY et al., 1992; ROGERS, 1993; SIMOES et al., 1994; ROGERS, 1996; ABADIE et al., 1999; TORTELLY et al., 2000; FAN e LORIMIER, 2005).

Northup et al. (2005) demonstraram uma diferença significativa entre patologistas na graduação histopatológica do mastocitoma, utilizando o sistema proposto por Patnaik et al. (1984). Apesar de a graduação apresentar valor preditivo quanto ao tempo de sobrevida nos tumores bem diferenciados e nos pouco diferenciados, os tumores de grau intermediário (grau II) apresentam dificuldades de avaliação (TORTELLY et al., 2000; KIUPEL et al., 2004).

Alguns autores, com o objetivo de complementar essa graduação, iniciaram estudos correlacionando diferentes técnicas à graduação histopatológica e alguns a correlacionaram à sobrevida desses animais. Dentre eles a contagem de figuras de mitoses, AgNOR, avaliação da expressão de Ki-67, PCNA, p53, c-Kit, metaloproteinases, além de estudos comparando a aneuploidia ou diploidia dos tumores com a graduação e o estadiamento clínico da doença (AYL et al., 1992; SIMÕES et al., 1994; ABADIE et al., 1999; JAFFE et al., 2000).

2.2. *Cicloxigenase e Prostaglandina E2*

A Cicloxigenase (COX), sinônimo para prostaglandina H sintetase, é uma enzima bifuncional que catalisa a ciclo-oxigenação e peroxidação do ácido araquidônico derivado da membrana celular para a conversão em prostaglandinas (PGs) (DUBOIS et al., 1998; HAYES, 2007).

As PGs têm grande importância, porque desempenham importantes papéis nos processos fisiológicos normais e regulação da homeostase em

diversos tecidos do organismo, dentre eles a resposta inflamatória, citoproteção gastrointestinal, hemostasia e hemodinâmica renal (MOHAMMED et al., 2001; MÉRIC, 2006).

Nas últimas duas décadas, numerosos estudos clínicos, experimentais e epidemiológicos com as células tumorais humanas têm ligado a presença da ciclooxigenase (COX) e um de seus metabólitos, a prostaglandina E2 (PGE2), com o desenvolvimento e a progressão do tumoral (EARNEST et al., 1992; FOLKMAN et al., 1997; BEAM et al., 2003).

A hipótese da ação entre a COX e o desenvolvimento das neoplasias surgiu a partir da observação da regressão das neoplasias de pacientes com câncer de cólon que, por apresentar dor, faziam uso crônico de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs). Essa observação clínica, contudo, não apresentava base científica que explicasse esse acontecimento. Novas hipóteses foram então avaliadas e a atividade da COX, sua correlação com crescimento celular e ação de oncogenes foram testadas (OSHIMA et al., 1996; BAKHLE, 2001; HAYES, 2007).

Um resultado crucial para essa hipótese foi estabelecido por EBERHART et al. (1994), que mostraram a presença da COX-2 no tecido neoplásico (câncer de cólon) e sua ausência em tecido normal (intestino). A COX-1 estava expressa em ambos igualmente.

Atualmente o desenvolvimento tumoral tem sido considerado uma consequência das múltiplas ações da superexpressão de COX-2 e suas propriedades de iniciação, promoção e progressão tumoral, que atuam nas células neoplásicas por meio da potencialização dos danos de DNA por radicais livres, inibição da apoptose, rompimento das barreiras teciduais, diminuição da adesão celular, aumento da capacidade de invasão, promoção da angiogênese, metástase, modulação da inflamação e diminuição da resposta imune (TSUJII e DUBOIS, 1995; LIU e ROSE, 1996; TSUJII et al., 1997; MURATA et al., 1999; SOUZA et al., 2000; KUKARNI et al., 2001; ; ZHA et al., 2001; BOL et al., 2002; CAO e PRESCOTT, 2002; DONG et al., 2003; WANG e DUBOIS, 2004; HAYES, 2007).

Estudos avaliando a expressão de COX-2 em neoplasias caninas permitiram observar que tumores com menor diferenciação histopatológica ou com comportamento biológico mais agressivo apresentaram uma expressão

de COX-2 maior que tumores mais diferenciados ou de melhor prognóstico. Esses dados vêm corroborar a hipótese da ação da COX-2 na progressão tumoral e no desencadeamento de um pior prognóstico para o paciente (DORÉ et al., 2003; MOHAMED et al., 2004; CALDERÓN, 2005; HELLER et al., 2005; BERSSANO, 2006; DE NARDI 2007).

Apesar de a COX-2 aumentar a sensibilidade à indução de carcinógenos suficientemente para induzir à carcinogênese em certos tipos de tecidos, alguns autores relatam que ela não é responsável pela iniciação do processo neoplásico (CAO e PRESCOTT, 2002; WANG e DUBOIS, 2004).

A PGE2 é um dos metabólitos do ácido araquidônico, produzido pelas COX-1 e COX-2 (MASFERRER et al., 2000), e muitos estudos têm demonstrado grande interesse na descoberta de uma possível ligação entre a COX e a PGE2, no mecanismo do desenvolvimento e progressão do câncer (LUPULESCU et al., 1996; ARA et al., 1996).

O mecanismo pelo qual a PGE2 e outros metabólitos do ácido araquidônico atuam na iniciação, promoção e progressão tumoral também não está totalmente elucidado (WANG e DUBOIS, 2004).

Cao e Prescott (2002) descrevem que a PGE2 tem atuação em eventos que promovem o crescimento tumoral e a correlacionam ao fator de crescimento epidermal (EGF).

Outros autores têm relatado que o aumento da PGE2 possui um papel importante no sistema imune, pois regula a resposta dos linfócitos T e ativação da maturação dos linfócitos B. Em neoplasias, as células tumorais podem liberar macrófagos derivados de PGE2, que inibem linfocinas regulatórias do sistema imune, a proliferação de linfócitos B e T, e atividade citotóxica dos linfócitos T *killers*, favorecendo portanto o crescimento tumoral (ROCCA et al., 1999; SOUZA et al., 2000; HAYES, 2007).

A literatura descreve ainda que, no câncer de mama, a PGE2 foi associada à indução da angiogênese desde os estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico, e o uso de drogas antiinflamatórias não seletivas inibiu a PGE2 e a angiogênese, contribuindo para demonstrar o papel da PGE2 na angiogênese tumoral (WANG e DUBOIS, 2004).

Souza et al. (2000) citam que a morte celular programada pode também estar associada à ação da PGE2, induzindo a expressão de bcl-2 e pela elevação dos níveis de AMP cíclico, que podem suprimir a apoptose.

Estudos com inibidores da COX (COXIBs) e PGE2 têm gerado resultados encorajadores e significantes efeitos em reduzir ou inibir a incidência e a progressão de tumores em modelos animais e no tratamento de pacientes com câncer (KNAPP et al., 2000; MÉRIC et al., 2006).

Essa proposta oferece uma base científica para uma bem sucedida prevenção do câncer e uma real perspectiva do uso de drogas no tratamento da doença diagnosticada, sem os efeitos colaterais freqüentemente associados com a quimioterapia convencional (BAKHLE, 2001).

Hayes (2007) descreve a importância de ampliar os estudos sobre a COX-2 em humanos e, nos animais, sugere a necessidade de um maior número de estudos que avaliem a expressão da COX-2 nos tumores, bem como sua correlação entre interação medicamentosa dos inibidores específicos e sobrevida desses animais.

Estudo anteriormente realizado por este grupo detectou a presença da COX-2 pela técnica de imunoistoquímica, usando anticorpo policlonal nos mastocitomas cutâneos caninos e correlacionou ao índice de proliferação celular. Os tumores com maior proliferação celular também foram os com menor diferenciação celular e maior expressão de COX-2. Outro achado foi a forte marcação de COX-2 em mastócitos neoplásicos presentes em vasos linfáticos (êmbolo neoplásico), isso demonstra a presença da expressão de COX-2 em células neoplásicas com maior agressividade e potencial metastático, uma vez que estas estão realizando estágios mais avançados do desenvolvimento neoplásico, as metástases.

2.3. Apoptose e a COX-2

A manutenção do número de células num tecido é feita pelo controle dos mecanismos de proliferação e da apoptose. Nos processos neoplásicos ocorre um desequilíbrio nesses mecanismos, desencadeando proliferação

celular descontrolada e redução na capacidade de as células neoplásicas sofrerem apoptose (OKADA e MAK, 2004; MAO et al., 2008).

O conhecimento sobre a apoptose é muito importante para entender a biologia das neoplasias, além de trazer novas abordagens para o tratamento das doenças (MAO et al., 2008).

Na prática oncológica, a importância da identificação de células apoptóticas em tumores se dá pela sua correlação com o sucesso do tratamento, devido à involução do tumor após a administração de quimioterápicos, avaliando-se o aumento do número de células que entraram em apoptose (CARSON e RIBEIRO, 1993; BROWN e WOUNTERS, 1999; SCHIMITT e LOWE, 1999; SCHWERDT et al., 2005; LUZ et al., 2006).

A inibição da apoptose prolonga o tempo de vida de células anormais, permitindo assim maior tempo para a acumulação de múltiplas mutações genéticas, que resultam em transformações fenotípicas e promoção do crescimento celular (KALTHOFF, 2003; EIBL et al., 2003).

Estudos têm mostrado que, apesar da grande variação no índice apoptótico nos diferentes tipos de neoplasia, a apoptose é geralmente maior no câncer, o que é um achado desejável. É bem estabelecido que a maioria dos quimioterápicos elimina células neoplásicas por apoptose, deixando a sugestão de que a resistência à quimioterapia é atribuída à inativação dos mecanismos da apoptose nas células tumorais (BROWN e WOUTERS, 1999).

O conhecimento sobre as complexas vias da apoptose auxiliou no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, devido à sua correlação com seu importante papel na patogênese tumoral e no comportamento biológico das neoplasias (KALTHOFF, 2003).

A caspase-3 em particular tem um papel crucial na via efetora da apoptose. Estudar sua presença nas neoplasias tem grande importância no controle da recorrência tumoral, desenvolvimento e tratamento de eleição (KALTHOFF, 2003; MAO et al., 2008).

A família das caspases (Cystein-dependent aspartate-especific protease) caracteriza-se como a principal via de regulação da morte celular programada (DEGTEREV et al., 2003; BUTKINAREE, et al., 2008).

As caspases são expressas na maioria das células vivas e são localizadas no citosol como proenzimas na sua forma inativa (ZIMMERMANN

e GREEN, 2001; GARRIDO e KROEMER, 2004; LAUNA et al., 2005; HAIL et al., 2006).

As caspases clivam seus alvos nos resíduos de ácido aspártico, e como mecanismo de proteção contra ativação inadvertida, essas enzimas são sintetizadas na forma de precursores inativos (zimogênios), necessitando de clivagem para iniciar sua ativação (CORY et al., 1999; OKADA e MAK, 2004; MAO et al., 2008).

Dentre os mecanismos de ação da COX-2, a diminuição da morte celular programada em células neoplásicas tem se destacado como uma das principais atuações na progressão tumoral, porém sua compreensão ainda não é totalmente clara (VANE et al., 1998; SUBBARAMAIAH et al., 1999; WANG e DUBOIS, 2004).

Em humanos, células neoplásicas tratadas com PGE₂, mantêm a hipótese de que a expressão de COX-2 pode promover o crescimento tumoral em parte por resistência à apoptose (BOL et al., 2002; CAO e PRESCOTT, 2002).

Como a falha na apoptose é um evento de grande importância na progressão e resistência à terapia citotóxica dos antineoplásicos e principal mecanismo dos COXIBs, avanços na compreensão dos eventos moleculares da apoptose demonstram que o uso dos inibidores seletivos para COX-2 ativam as caspases pela via intrínseca, através da liberação do citocromo C proveniente da mitocôndria celular (SUN et al., 2002; LIU et al., 2005; FERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2006; TESEI et al., 2007).

Fernandez-Martinez et al. (2006) descrevem que a inibição das caspases 3, 8 e 9 pode ocorrer em células hepáticas humanas que expressam COX-2.

2.4. Angiogênese e a COX-2

A angiogênese é um processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos já existentes, que ocorre em várias situações, como durante o desenvolvimento e crescimento fetal, processos inflamatórios, reparação de feridas e processos neoplásicos. É regulada pelo equilíbrio entre promotores

(angiogênicos) e inibidores (angiostáticos). De acordo com a expressão dessas moléculas, dá-se ou não a formação de novos vasos (GARGETT et al., 2001; ADDISON et al., 2005).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico (TGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e angiopoetina 1 são os fatores angiogênicos mais importantes (COSTA et al., 2002).

O VEGF, também chamado de fator de permeabilidade vascular, devido a sua habilidade em aumentar a permeabilidade dos vasos, é um potente indutor de angiogênese, pois estimula a migração e proliferação de células endoteliais vasculares (LEUNG et al., 1989; LUI et al., 1995; FERRARA, 1996; COSTA et al., 2002) e é produzido por células neoplásicas, macrófagos, plasmócitos, algumas vezes por linfócitos (BALSARI et al., 1999).

A angiogênese é muito importante no processo biológico das neoplasias. Ela é crucial para o crescimento de um tumor primário, pois a maioria dos tumores sólidos necessita de novos vasos sanguíneos para prover os nutrientes necessários para garantir seu crescimento e sobrevivência. A provisão desse novo aporte sanguíneo tem papel fundamental no desenvolvimento das metástases (MEYERS e WATSON, 2003; NIJSTEN et al., 2004; WANG e DUBOIS, 2004; PANAYIOTIS et al., 2005).

Em condições neoplásicas, os fatores pró-angiogênicos superam os anti-angiogênicos, garantindo a angiogênese patológica. O processo de neovascularização tumoral segue as seguintes etapas: produção de fatores de crescimento pró-angiogênicos, ativação das células endoteliais, degradação da matriz extracelular, migração e proliferação das células endoteliais, adesão celular, reorganização da matriz extracelular e início do fluxo sanguíneo (CHUN e THAM, 2007).

Apesar de muitos fatores angiogênicos causarem angiogênese tumoral, o VEGF é o mais estudado, pois ele induz a proliferação, diferenciação e migração das células endoteliais, aumenta a permeabilidade capilar e prolonga o tempo de vida das neovascularizações, diminuindo a apoptose pela indução de Bcl2, além de produzir collagenase e outras enzimas que facilitam à célula neoplásica perder a coesão celular e adentrar na circulação sanguínea (MOSCATELLI et al., 1981; RANIERI et al., 2001; ADDISON et al., 2005).

Os níveis de expressão do VEGF em tumores primários podem refletir as características biológicas dos tumores em termos de agressividade e com isso contribuir com informações para o prognóstico (RANIERI et al., 2001; PARADISO et al., 2001; RANIERI et al., 2003; ADDISON et al., 2005).

O aumento da síntese de VEGF é considerado uma das primeiras influências para a angiogênese, contribuindo assim para o desenvolvimento de características malignas, como crescimento acelerado e metástases (DE JONG et al., 1998).

A literatura descreve que, em humanos, as neoplasias indiferenciadas, ou com classificação histopatológica correspondente a indiferenciação, podem apresentar altos níveis séricos de VEGF e algumas vezes são associadas ao estágio tumoral, demonstrando pior prognóstico (ACHEN et al., 1998; ADAMS et al., 2000; PANAYIOTIS et al., 2005; LETCHOUMY et al., 2005).

O uso de inibidores da angiogênese tumoral é atualmente um grande alvo na terapia contra o câncer. Mais de 150 componentes antiangiogênicos têm sido desenvolvidos, sendo a maioria associada ao VEGF e seus receptores, portanto determinar a expressão do VEGF nas neoplasias pode ser extremamente útil como fator prognóstico ou orientação terapêutica (PANAYIOTIS et al., 2005).

Muitos mecanismos têm sido sugeridos para explicar como o aumento de COX-2 e seus metabólitos (as prostaglandinas) podem contribuir na carcinogênese. Recentemente os estudos têm se direcionado a favor de um mecanismo que liga a super expressão da COX-2 ao aumento dos fatores de crescimento vascular e angiogênese tumoral (HAYES, 2007).

Em 2000, Khan e colaboradores descreveram a ausência de detecção da expressão da COX-2 nos vasos ou na vascularização tumoral em tumores de vasos, porém observaram a inibição dessas prostaglandinas pelas drogas antiinflamatórias e diminuição da massa tumoral. Já outros autores verificaram uma íntima relação entre VEGF, COX-2 e as prostaglandinas, como PGE₂, e correlação positiva entre a expressão de VEGF e COX-2, com a densidade microvascular e angiogênese (CIANCHI et al., 2001; GALLO et al., 2001).

A PGE₂, como um importante mediador inflamatório, foi o maior indutor da potente isoforma proangiogênica VEGF-A em mastócitos, de humanos. A

PGE2 induziu VEGF-A em culturas de mastócitos como relatado por Abdel-Majid et al. (2004).

Os mecanismos pelos quais a PGE2 estimula o VEGF ainda continuam indefinidos, no entanto Eibl et al. (2003) sugerem que o ácido araquidônico é convertido em PGE2 através da ação específica da COX-2, o que aumenta os níveis de VEGF, de forma autócrina e parácrina, estimulando a migração de células endoteliais.

O crescimento tumoral foi marcadamente atenuado em células de carcinoma pulmonar de Lewis implantadas em um camundongo geneticamente deficiente de COX-2. Mais ainda, a diminuição na densidade vascular foi observada no crescimento do tumor nesse camundongo deficiente de COX-2, sugerindo que COX-2 poderia regular a densidade vascular intratumoral (ALMEIDA et al., 2001).

O uso de drogas antiinflamatórias inibidoras específicas para COX-2, em camundongos com células tumorais positivas para COX-2, diminuiu a angiogênese e o crescimento tumoral, entretanto nas células negativas para COX-2 não foi observado nenhum efeito no volume ou no índice de angiogênese. Outra observação foi quanto aos fibroblastos desses camundongos. Esses, quando negativos para COX-2, apresentavam redução na capacidade de produzir o fator angiogênico VEGF. Esses dados reforçam a idéia do envolvimento da expressão de COX-2 e a proposta de uma terapia antiangiogênica bloqueando COX-2 (PRESCOTT, 2000; WILLIAMS et al., 2000).

Com base em diversos estudos conclui-se que a COX-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 angiogênese. (MASFERRER et al., 1999; BAKHLE, 2001; CHIANCHI et al., 2001; MEYERS e WATSON, 2003; NIJSTEN et al., 2004; WANG e DUBOIS, 2004).

3. OBJETIVOS

Tendo em vista a alta frequência do mastocitoma canino, a importância da graduação histopatológica e sua correlação com o prognóstico, os objetivos deste trabalho são:

- Avaliar a expressão da cicloxigenase-2 nos mastocitomas caninos, pela imunomarcção com o anticorpo primário anti-COX-2 e correlacioná-la com a graduação histopatológica;
- Avaliar o índice apoptótico nos mastocitomas caninos, pela imunomarcção com o anticorpo primário anti-caspase-3 clivada, e correlacioná-lo com a graduação histopatológica;
- Correlacionar o índice apoptótico com o percentual de positividade de COX-2 nos mastocitomas caninos nos diferentes graus histopatológicos;
- Avaliar a expressão da PGE2 nos mastocitomas caninos, pela imunomarcção com o anticorpo primário anti-PGE2 e correlacioná-lo com a graduação histopatológica;
- Avaliar a expressão do VEGF nos mastocitomas caninos, pela imunomarcção com o anticorpo primário anti-VEGF e correlacioná-lo com a graduação histopatológica;
- Correlacionar a imunomarcção da COX-2 com a imunomarcção da PGE2 e do VEGF nos diferentes graus histopatológicos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. *Seleção das amostras e análise histopatológica*

Para a realização deste estudo foram selecionados casos com diagnóstico de mastocitoma cutâneo canino, registrados nos livros histopatológicos (peças cirúrgicas) e do Laboratório de Patologia Veterinária (LPAVET), referentes aos anos de 2004 a 2007, do arquivo do Serviço de Patologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu. Na seleção dos casos não houve predileção de raça, sexo ou idade.

Os dados referentes a raça, sexo e idade dos animais foram anotados e os blocos de parafina separados.

Dos casos selecionados, foram confeccionadas novas lâminas em micrótomo, com espessura de 3µm e posteriormente submetidas a imunomarcação com c-Kit (CD117), a fim de se confirmar o diagnóstico de mastocitoma. Outros cortes foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE) e Azul de Toluidina (AT), de acordo com Luna et al., (1968), com o intuito de estabelecer a graduação histopatológica. Somente os casos com marcação positiva para c-Kit foram selecionados.

A graduação histopatológica foi realizada por três patologistas da FMVZ- UNESP, Botucatu, todos com residência em Patologia Veterinária, dois com mestrado e o outro com doutorado, todos na área de concentração em Patologia Veterinária. A leitura foi realizada isoladamente, baseando-se na classificação proposta por Patnaik et al. (1984).

A graduação final foi estabelecida quando dois observadores concordavam.

4.2. *Imunoistoquímica*

A técnica de imunoistoquímica realizada baseou-se em Hsu et al. (1981), com adaptação de acordo com o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Serviço de Patologia da FMVZ – UNESP – Botucatu.

Os blocos de parafina foram novamente cortados em micrótomo com espessura de três μm , distendidos em lâminas histológicas devidamente preparadas com cola líquida à base de organosilano (A3648 - Sigma) e transferidas para cubas de vidro vertical. Posteriormente eram estocadas em estufa com temperatura entre 55 e 58°C por 24 horas, a fim de realizar-se a técnica de imunoistoquímica.

Após esse procedimento, as lâminas foram submetidas aos processos de desparafinização e hidratação.

Para o anticorpo primário anti-caspase-3, a recuperação antigênica foi feita com solução de citrato 10mM, pH6,0 pré-aquecida a 96°C em banho-maria. Após a solução atingir essa temperatura, as lâminas foram colocadas na solução por 30 minutos, posteriormente retiradas e mantidas à temperatura ambiente para resfriamento.

Para o anticorpo anti-PGE2 e anti-COX-2, foram utilizadas soluções tampão de Citrato 10mM, pH 6,0 em forno microondas por 15 minutos (três ciclos de cinco minutos em potência máxima). Para o anticorpo anti-VEGF, a recuperação antigênica foi feita com solução pré-aquecida de Tris-EDTA pH 9,0 em banho-maria a 96 °C, por 30 minutos. Posteriormente foram colocadas em temperatura ambiente para resfriamento.

O bloqueio da peroxidase endógena consistiu em imergir as lâminas em uma solução de água oxigenada 3% por 20 minutos.

Em câmara úmida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 1), que foram previamente diluídos com o diluente para anticorpos com propriedades redutoras de fundo (DakoCytomation cód. S3022), em câmara úmida por 18 horas (“over-night”), à temperatura de 4°C.

Como sistema de amplificação utilizou-se o Envision Dual Link (Dako cód. K4065) por uma hora, a temperatura ambiente.

Como controle negativo, substituíram-se os anticorpos primários policlonais por imunoglobulina de coelho (Dako cód. X0903), para as reações com PGE2 e caspase-3, e foi utilizada imunoglobulina de camundongo (Dako cód. N1698) no lugar dos anticorpos primários monoclonais (VEGF e COX-2), nas mesmas condições das lâminas com anticorpo primário.

Utilizou-se a solução cromógena de DAB líquido (Dako cód. K34466), de acordo com as indicações do fabricante e as lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Mayer.

TABELA 1: Relação dos anticorpos primários utilizados, tipo de marcação, clone, marca e diluições padronizadas, utilizadas nos cortes histopatológicos dos casos de mastocitoma cutâneo canino, no período de 2004 a 2007. FMVZ - UNESP – Botucatu, SP.

Anticorpo 1°	Tipo de marcação	Clone	Marca	Diluição Padronizada
CASPASE-3 Clivada	Citoplasmática	Asp 175	Cell Signing	1:50
COX-2	Citoplasmática	CX-294	DakoCytomation	1:50
PGE2	Citoplasmática	PG31	Oxford Biomedical Research	1:200
VEGF	Citoplasmática	VG1	Dako M7273	1:25

4.3. Avaliação da marcação

Para evitar a escolha de um único campo e possivelmente predispor a uma quantificação superestimada ou subestimada da imunomarcacão positiva, decidiu-se avaliar a expressão dos anticorpos primários empregados (caspase-3, COX-2, PGE2 e VEGF) em todo o corte histopatológico, sendo assim, instituiu-se um escore (Tabela 2), que se relacionava ao percentual de células marcadas (PCM) em toda a lâmina (Figura 1). Esse procedimento foi adaptado de De Nardi, 2007.

TABELA 2:Escore (PCM) atribuído a lâmina referente ao percentual de células neoplásicas marcadas em todo o corte histopatológico, nos casos de mastocitoma cutâneo canino (Forma adaptada de De Nardi, 2007).

Percentual de células marcadas (PCM)	Escore
< 5%	0
5 – 25 %	1
26 – 50%	2
51 – 75%	3
> 75%	4

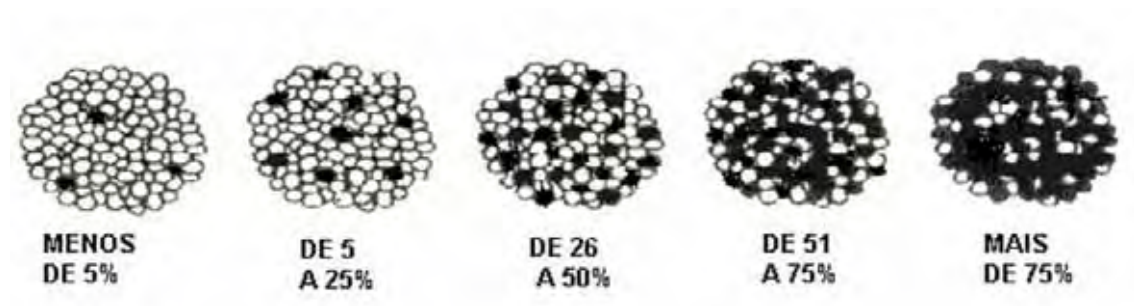


FIGURA 1:Método para avaliar o percentual de imunomarcação das células neoplásicas em todo o corte histopatológico, nos mastocitomas caninos do período de 2004 a 2007. FMVZ - UNESP – Botucatu, SP (Forma adaptada de De Nardi, 2007).

Para VEGF e PGE2, o método utilizado foi exclusivamente a determinação do escore baseado no PCM, descrito anteriormente.

Para a caspase-3 e COX-2, além de determinar o PCM, optou-se por também realizar a contagem das células com imunomarcação positiva.

O índice apoptótico e o percentual de positividade para COX-2 foram obtidos após escolha de um campo representativo da marcação positiva para caspase-3 e COX-2, respectivamente.

A contagem das células neoplásicas foi realizada em um campo de maior aumento, onde o número de células neoplásicas deveria ser igual ou superior a 100. Casos onde o número de células do campo eleito como

representativo era inferior a 100, um novo campo era escolhido e todas as células eram contadas e somadas à contagem do campo anterior. Independente da obtenção de números superiores a 100, todo campo seguinte era sempre contado.

A contagem iniciava com células com marcação citoplasmática positiva (identificados pela coloração acastanhada) e finalizada com demais células neoplásicas negativas, até totalizar a contagem de todo o campo. Obtinha-se assim um percentual de positividade para caspase-3 (índice apoptótico) e COX-2.

As imagens foram obtidas com auxílio do programa de análise de imagens QWIN (V 3.0 Leica), que permite a captura de imagens pela câmera digital Leica DFC, acoplada a um microscópio óptico (Leica DMR).

Os escores (PCM) de marcação para cada anticorpo (PGE2, VEGF, COX-2 e caspase-3) e o percentual de positividade da COX-2 e caspase-3 (índice apoptótico) foram agrupados de acordo com a graduação histopatológica determinada na coloração de HE.

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Sigmastat 3.5., considerando-se com nível de significância $p < 0,05$.

Para avaliar a normalidade e determinar se os dados adquiridos apresentavam distribuição Gaussiana, os dados foram primeiramente submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar os dados que não apresentaram distribuição Gaussiana (percentual de marcação de COX-2 e escores de marcação de COX-2, PGE2, VEGF, caspase-3 e índice apoptótico) com a graduação histopatológica, fez-se o teste de Kruskal-Wallis, sendo posteriormente avaliados pelo teste Dunn.

Para averiguar a existência de possíveis interações entre os marcadores nos diferentes graus histopatológicos, os dados foram submetidos ao teste de Pearson e considerou-se nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. *Estudo retrospectivo*

Foram selecionados 24 casos de mastocitomas cutâneos caninos com dados referentes a raça, sexo e idade. Os demais dados como localização ou história clínica não foram anotados, devido à falta de padronização das informações, ou ausência da história em muitos deles.

Neste estudo, dos 24 casos selecionados, 12,5% (três) foram cães sem raça definida (SRD) e 87,5% (21) com a raça determinada (Figura 2). Dentre as raças mais acometidas, 38% (oito) foram boxer, 19% (quatro) labrador, 14% (três) pit bull, 10% (dois) fox paulistinha e 19%(quatro) pertenciam a outras diversas raças (Figura 3). De acordo com Sequeira et al. (1999) não existem dados sobre a composição racial da população dos cães da região de Botucatu, porém, observou-se que a prevalência racial manteve-se semelhante à da literatura, em que o boxer e o labrador são as raças mais acometidas (O'KEEFE, 1990; TARDY et al., 1992; SIMÕES et al., 1994; FOX, 1998; TORTELLY et al., 2000; WEISSE et al., 2002; LONDON e SEGUIN, 2003; ROMANSIK et al., 2007; THAMM e VAIL, 2007).

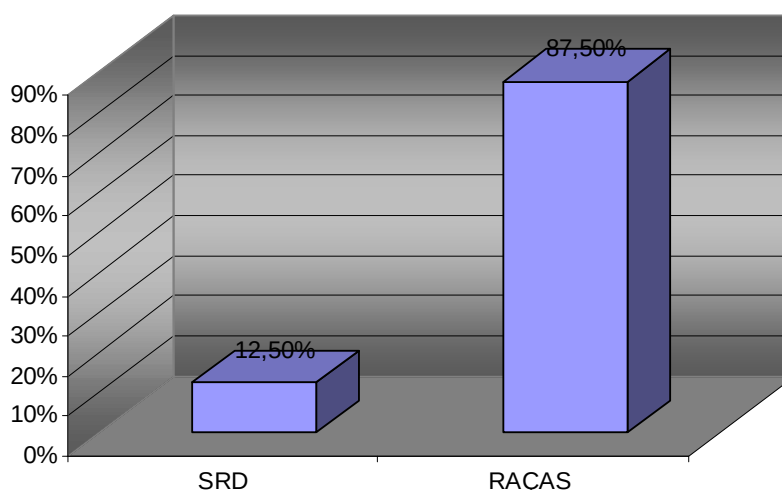


FIGURA 2:Distribuição do percentual do número de animais acometidos por mastocitoma, com raça e sem raça definida, durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu, (n=24)

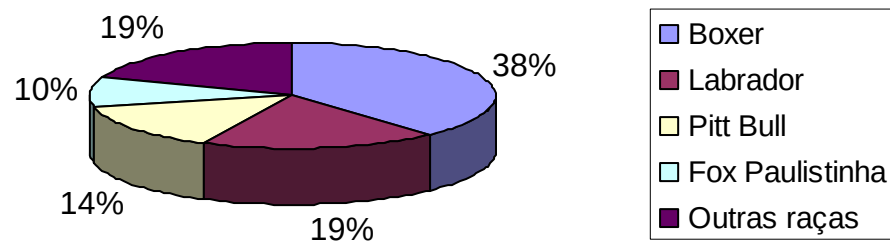


FIGURA 3: Distribuição das raças dos cães acometidos por mastocitoma cutâneo canino (n=21), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

Em relação ao sexo, observou-se um percentual superior de machos 67% (n=16), em relação às fêmeas 33% (n=8) (Figura 4), achado este semelhante ao de Weisse et al. (2002). Apesar de se ter obtido o dobro de machos em relação às fêmeas, isso provavelmente se deve ao tipo de amostragem utilizada e não a uma representação da população e nem predileção sexual do mastocitoma, já que a literatura descreve que não há predisposição sexual para o desenvolvimento dessa neoplasia (BOSTOCK et al., 1989; O'KEEFE, 1990; TORTELLY et al., 2000; THAMM e VAIL, 2007).

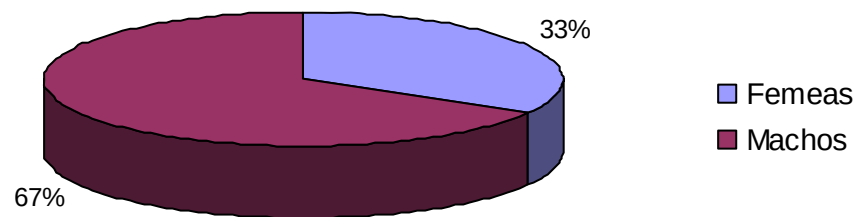


FIGURA 4: Porcentagem de animais do sexo feminino e masculino acometidos por mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu.

Em relação à idade dos animais, houve variação de dois a 11 anos, e média de 6,25 anos. A partir dos cinco anos de idade a incidência desta neoplasia aumentou, e 75 % dos animais apresentaram idade superior a cinco anos.

Embora a idade não seja um fator único e decisivo para o desenvolvimento das neoplasias, a alta prevalência dos mastocitomas parece estar correlacionada com a maior longevidade dos animais (THAMM e VAIL, 2007).

A maior parte dos autores descreve que os animais acometidos pelo mastocitoma têm em média oito anos de idade, porém existem relatos onde se observa essa neoplasia em animais com idade que varia de dois a 17 anos (O'KEEFE, 1990; TARDY et al., 1992; FAN et al., 2001; OSAKI et al., 2002; LONDON & SEGUIN 2003).

Tham e Vail (2007), no entanto, descrevem que a idade com maior incidência é dez anos, semelhantes dados foram observados neste estudo, onde 20,83% dos animais tinham essa idade (Figura 5).

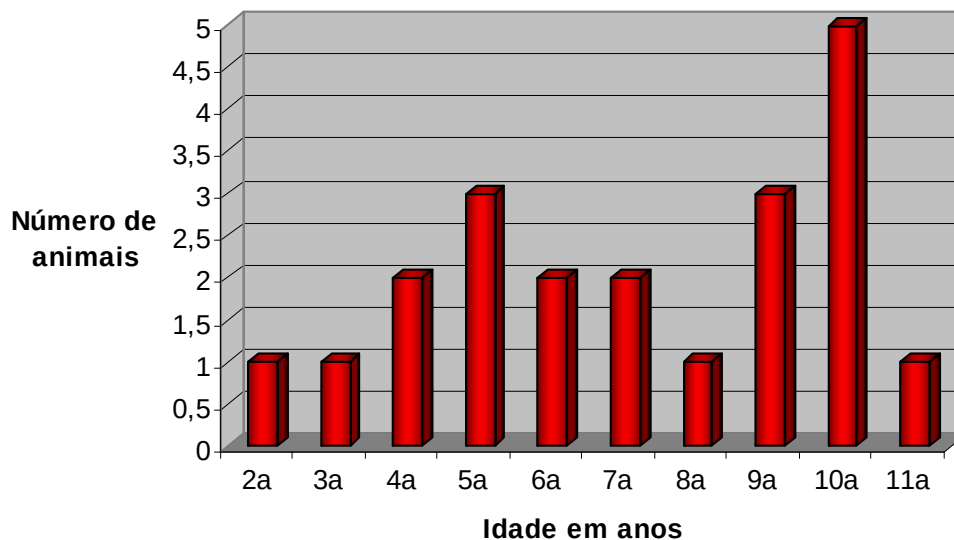


FIGURA 5: Distribuição de cães de acordo com a idade dos animais que desenvolveram mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

5.2. Análise histopatológica

Os 24 casos de mastocitoma foram classificados de acordo com os critérios propostos por Patnaik et al. (1984), onde 8,4% (dois) foram classificados como Grau I; 58,3% (14), Grau II e 33,3% (8), Grau III (Figuras 6, 7, 8 e 9).

O maior número de neoplasias classificadas como grau II e III, e o baixo percentual de neoplasias grau I podem ser relacionados à casuística, pois comumente os proprietários tardam a trazer os animais acometidos pelo tumor e, freqüentemente a observação do nódulo se dá durante o exame clínico, realizado pelo médico veterinário. Outra explicação, são as limitações do sistema de graduação descrito por Patnaik et al. (1984), como quantidade de granulação citoplasmática, grau de pleomorfismo celular e número de células binucleadas ou multinucleadas.

Pinczowski (2007) também observou discordância entre quatro observadores, no diagnóstico de 40 casos de mastocitoma canino, utilizando e graduação proposta por Patnaik et al. (1984). As principais divergências surgiram entre os graus I e II e, graus II e III. O autor descreve, ainda, que os

principais motivos da divergência ocorreram pelo fato de que, para parte dos observadores, alguns casos, onde havia menor quantidade de grânulos, além de anisocitose, evidenciavam um caráter mais maligno da neoplasia, sugerindo grau II. No entanto, a ausência de mitoses, binucleações, nucléolos evidentes e numerosos eosinófilos demonstra características benignas do tumor e a categorização no grau I para outros observadores. As diferenças entre os graus II e III ocorreram pela presença de características de malignidade, como ausência de granulações e mitoses, que caracterizam o potencial maligno da neoplasia, mas a ausência de células multinucleadas demonstraria não se tratar de uma neoplasia muito agressiva para alguns dos observadores.

Apesar de o sistema de Patnaik et al. (1984) ser o mais aceito entre os patologistas, ele apresenta limitações na sua classificação que podem gerar diferença na graduação entre observadores. Nessa sistematização, há critérios objetivos, como número de multinucleações e Figuras de mitose, mas, também, há características subjetivas, como, por exemplo, quantidade de granulação intracitoplasmática (GROSS et al., 2005; NORTHUP et al., 2005).

Tortelly et al. (2000) observaram dificuldade no escore de graduação proposto por Patnaik et al. (1984) no diagnóstico de rotina, e apontam para a necessidade de padrões diagnósticos definidos, que melhor orientem esse importante exame complementar.

Northup et al. (2005) tiveram divergências semelhantes, sendo necessário estabelecer previamente se tumores localizados no subcutâneo, ou com Figuras de mitoses poderiam ser classificados com tumores de baixo grau e, mesmo assim, a graduação apresentou diferenças entre os observadores.

Os critérios subjetivos podem resultar em um baixo número de neoplasias classificadas como grau I e maior número de Grau II

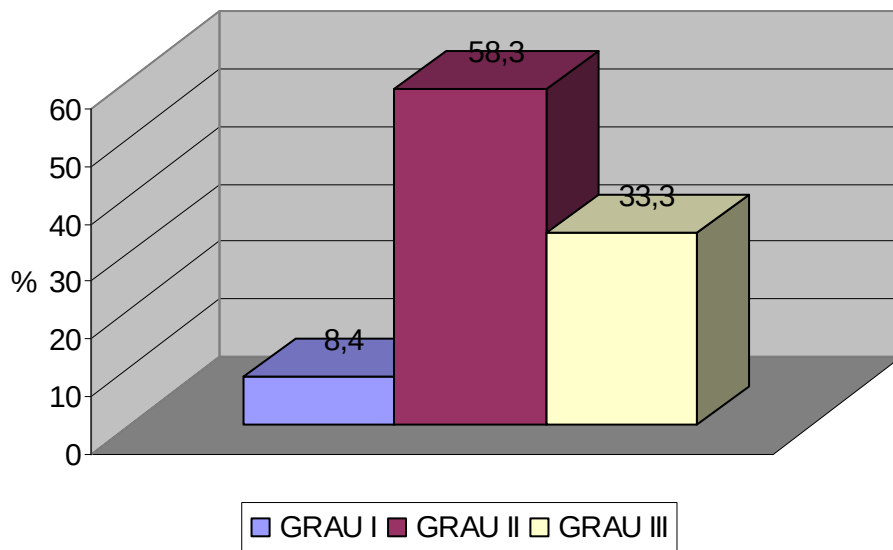


FIGURA 6: Distribuição dos mastocitomas cutâneos caninos, de acordo com a graduação histopatológica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

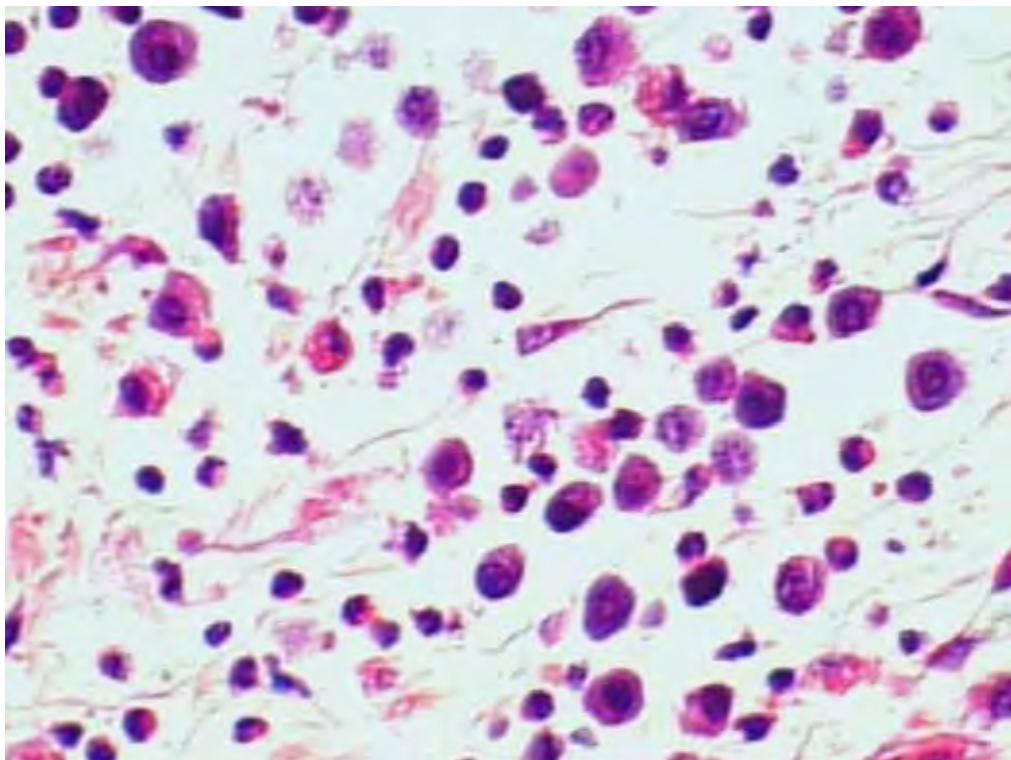
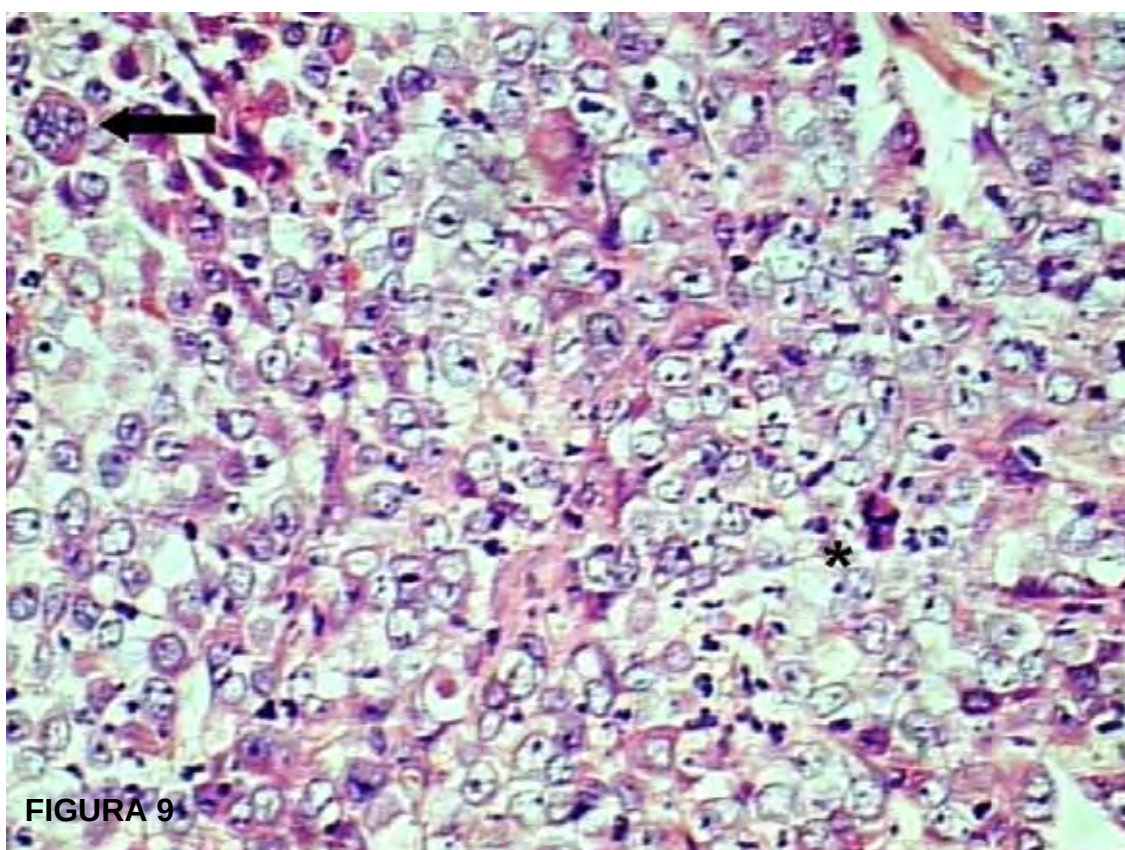
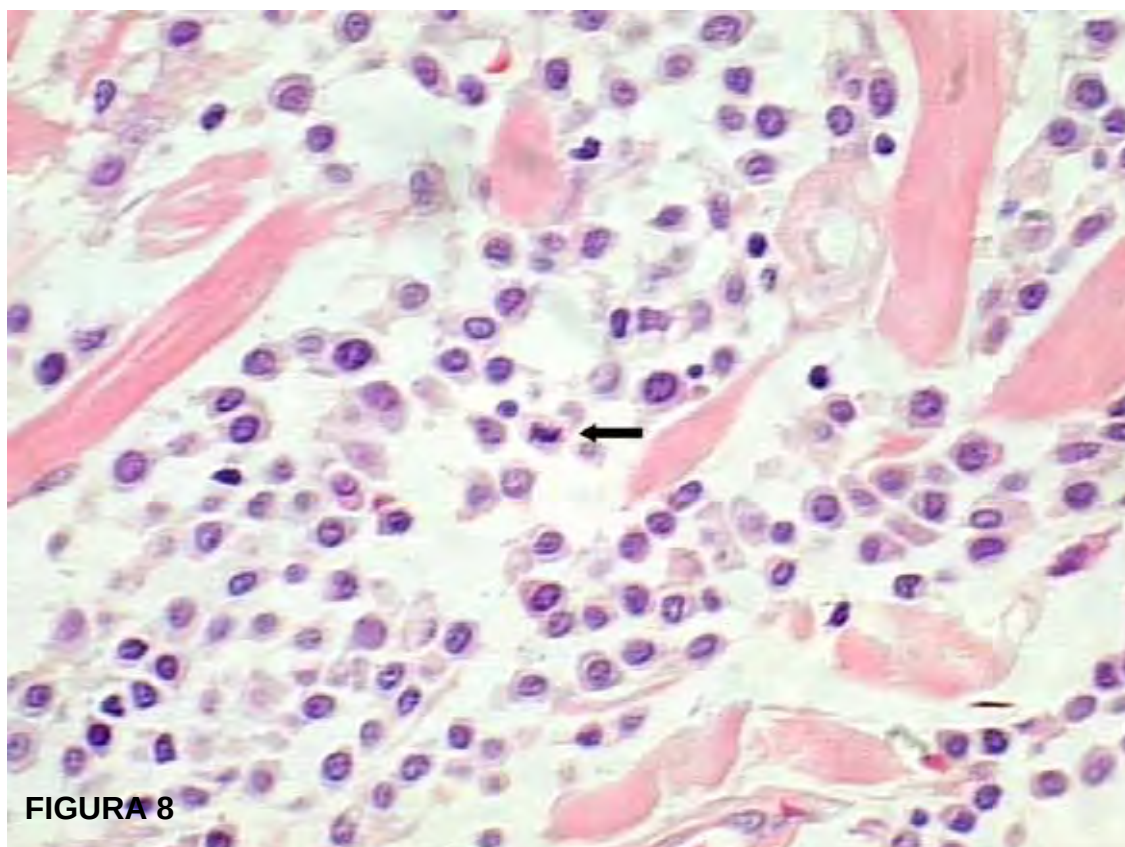


FIGURA 7: Corte histológico de um mastocitoma grau I: Presença de grande quantidade de eosinófilos e mastócitos neoplásicos com granulação intracitoplasmática evidente (H.E., Obj 40X)



(FIGURAS 8 e 9 legendas página seguinte)

FIGURA 8: Mastocitoma grau II, celularidade moderada, células redondas a ovóides, anisocitose moderada, citoplasma apresenta pouca granulação e presença de mitose (seta), (H.E., Obj 40X)

FIGURA 9: Mastocitoma grau III, alta celularidade, anisocitose, anisocariose, pleomorfismo, nucléolos evidentes únicos ou múltiplos e célula multinucleada (seta) e mitose atípica (*) (H.E. Obj 40X).

5.3. Análise imunoistoquímica

5.3.1. Avaliação da expressão da caspase-3

Todos os casos de mastocitoma apresentaram marcação positiva para caspase-3. Foi observada marcação citoplasmática (Figura 10) e nuclear, porém só foi considerada para a avaliação do índice apoptótico a marcação citoplasmática, que se baseia em Gown e Willingham (2002). Esses autores, para avaliar a expressão da caspase-3 clivada, estudaram sua marcação em cultura celular e em material histopatológico de arquivo de diversas neoplasias de humanos e demonstraram que a marcação para esse anticorpo deve ser citoplasmática, pois não foi evidenciado em nenhum dos casos marcação nuclear.

Todas as células marcadas, independentemente da variação na intensidade da marcação citoplasmática, foram contadas e correlacionadas à graduação histopatológica.

Donoghue et al. (1999) descrevem a marcação citoplasmática pontual para caspase-3 nos casos de linfoma em humanos correlacionando-a com um melhor prognóstico. Entretanto, alguns autores, apesar do conhecimento da existência de tal marcação, não a observaram em seus estudos em outras neoplasias de humanos (GOWN e WILLINGHAM, 2002; CÖR et al., 2004).

Não se observou marcação pontual citoplasmática nos mastocitomas caninos, no entanto, dentro deste grupo de pesquisa TORRES NETO (2008) avaliou, em aspirados citológicos dos mastocitomas caninos, a expressão da caspase-3, utilizando a técnica de imunocitoquímica, com o mesmo anticorpo primário e mesma diluição utilizada para as lâminas histopatológicas deste

estudo e detectou marcação pontual. Essa diferença pode ser justificada, pois o exame citológico permite visualização mais detalhada das células em relação ao exame histopatológico (RASKIN e MEYER, 2001).

A mediana do índice apoptótico (percentual de células com imunomarcação citoplasmática positiva para caspase-3), foi 16,9 % no grau I, 13,7 %, no grau II e 12,4 %, no grau III (Tabela 3 e Figura 11). Não houve diferença estatística entre os graus ($p^*=0,923$) e não há tendência para a diminuição da caspase-3 com a indiferenciação do tumor ($**p=0,762$, $r=-0,06$).

TABELA 03: Medianas do percentual de células com marcação citoplasmática para o anticorpo primário anti-caspase-3, nos três graus de mastocitoma

Graduação histopatológica	Grau I %	Grau II %	Grau III %	*P	**P	**r
Caspase-3	16,9(9,3-24,6)a	13,7(0,9-66,7) a	12,4(0,4-38,7)a	0,923	0,762	-0,06

* *Kruskal-Wallis posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).*

** *Correlação de Pearson.*

* *p mostra se há diferença entre os grupos.*

***p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.*

Letras minúsculas na mesma linha mostram correlação entre os graus.

Os escores (PCM) das lâminas avaliadas variaram entre zero e três, no entanto, na maioria dos casos (41,68%), a imunomarcação foi inferior a 5% (PCM=0). Os dados referentes à mediana dos escores grupos estão apresentados na Tabela 4. Não houve diferença estatística entre os graus ($p^*=0,946$) e não há tendência para a diminuição da caspase-3 com a indiferenciação do tumor ($**p=0,882$, $r=-0,038$).

TABELA 4: Medianas dos escores de marcação citoplasmática de caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino

Graduação histopatológica	Grau I %	Grau II %	Grau III %	*P	**P	**r
Caspase-3	1,0 (1,0-1,0)a	0,5 (0,0-2,0) a	1,0 (0,0-1,5)a	0,946	0,882	-0,038

* *Kruskal-Wallis posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).*

** *Correlação de Pearson.*

* *p mostra se há diferença entre os grupos.*

***p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.*

Letras minúsculas na mesma linha mostram diferença entre os graus.

Apesar de não se observar diferença estatística nos diferentes graus, nota-se que o índice apoptótico e o PCM, mesmo em tumores bem diferenciados (grau I), são baixos (índice apoptótico = 16,9%; PCM = 1,00).

Os dados sugerem que o índice apoptótico dos mastocitomas é baixo independentemente do grau histopatológico o que nos leva a deduzir, em parte, que a progressão tumoral ocorre devido à resistência a apoptose.

Não há publicações sobre a expressão da caspase-3 em cortes histopatológicos no mastocitoma canino, contudo Torres Neto (2008) observou dados semelhantes, onde mastocitomas grau citológico III (neoplasias indiferenciadas) apresentaram um menor índice apoptótico em relação ao grau II (neoplasias moderadamente diferenciadas), porém também sem diferença estatística.

Há dados na literatura que demonstram que neoplasias menos diferenciadas, ou de comportamento biológico mais agressivo, tendem a ter um menor índice apoptótico e, provavelmente, apresentam pior resposta ao uso de quimioterápicos antineoplásicos (CARSON e RIBEIRO, 1993; BROWN e WOUNTERS, 1999; SCHIMITT e LOWE, 1999; SCHWERDT et al., 2005; LUZ et al., 2006).

Os achados deste trabalho podem sugerir que como o mastocitoma possui baixo índice apoptótico, deve ser considerado como uma neoplasia que potencialmente pode apresentar comportamento biológico agressivo e com possível resposta ineficiente aos quimioterápicos antineoplásicos, em parte, devido à resistência a apoptose.

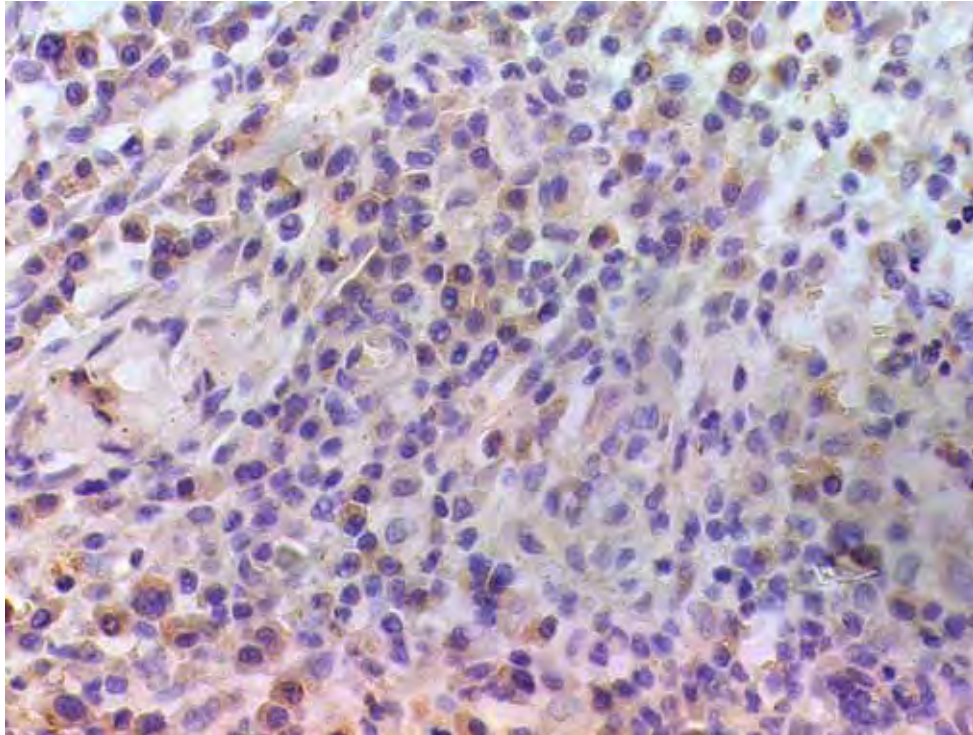


FIGURA 10: Mastocitoma grau III. Imunomarcção citoplasmática positiva para caspase-3 em mastócitos neoplásicos (Imunoistoquímica, caspase-3, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125).

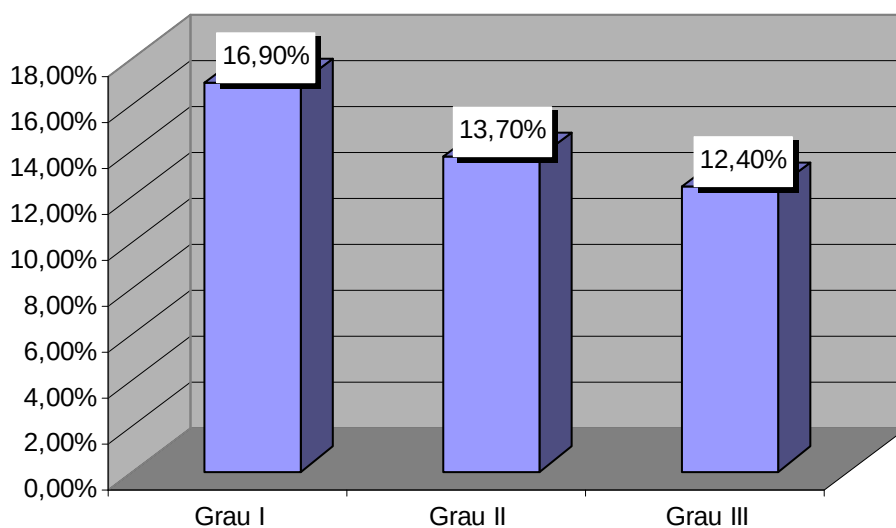


FIGURA 11: Índice apoptótico obtido pelo percentual de células com marcação citoplasmática para caspase-3 nos três graus do mastocitoma cutâneo canino, pela técnica de imunoistoquímica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

5.3.2. Avaliação da expressão da cicloxigenase-2

A marcação positiva para COX-2 foi identificada pela coloração marrom - acastanhada e granular no citoplasma das células neoplásicas (Figuras 12, 13 e 14). Foram consideradas todas as células positivas, independentemente da variação de intensidade da marcação.

Ao avaliar o percentual de positividade em campo de maior aumento, observou-se que o maior percentual se deu nas neoplasias de grau III (33,0 %) (Figura 15). A tabela 5 demonstra as medianas e análise estatística do percentual de células marcadas para COX-2, nos três diferentes graus do MCT. Não houve diferença estatística entre os graus (* $p=0,0895$) e não se observou tendência para o aumento da COX-2 conforme a indiferenciação do tumor (** $p=0,612$, $r=0,109$).

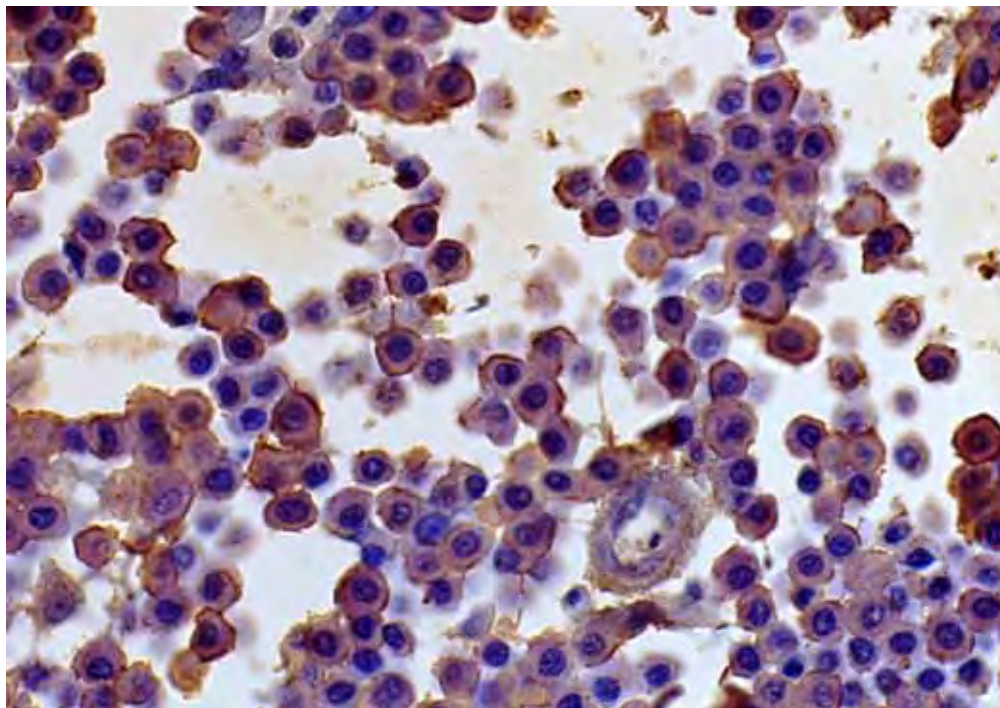


FIGURA 12: Mastocitoma canino grau I. Imunomarcacão citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125)

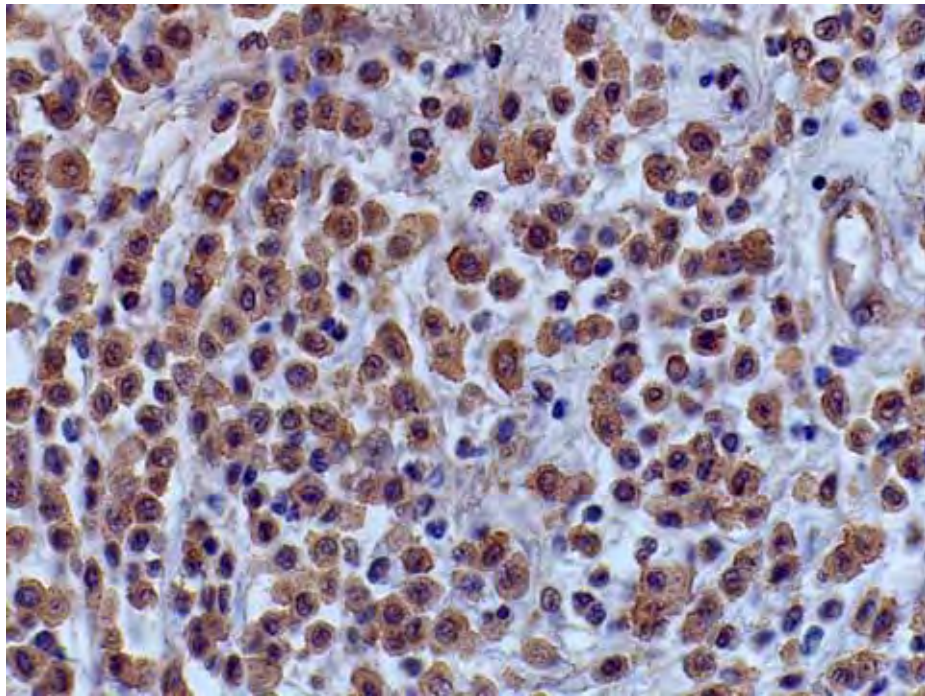


FIGURA 13: Mastocitoma canino grau II. Imunomarcacão citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125)

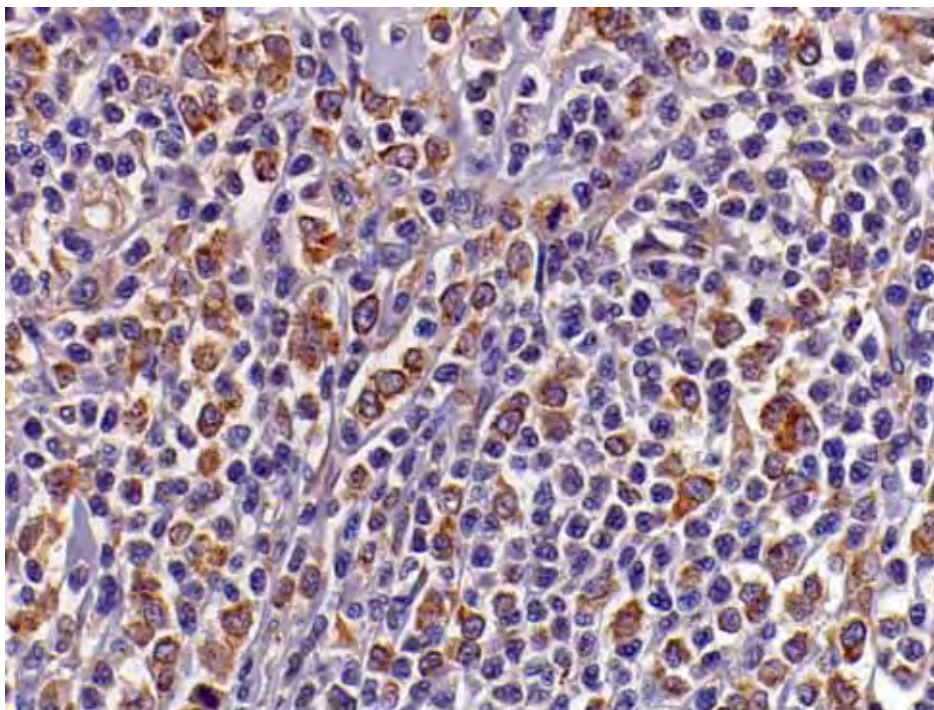


FIGURA 14: Mastocitoma canino grau III. Imunomarcacão citoplasmática positiva para COX-2 (Imunoistoquímica, COX-2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x125)

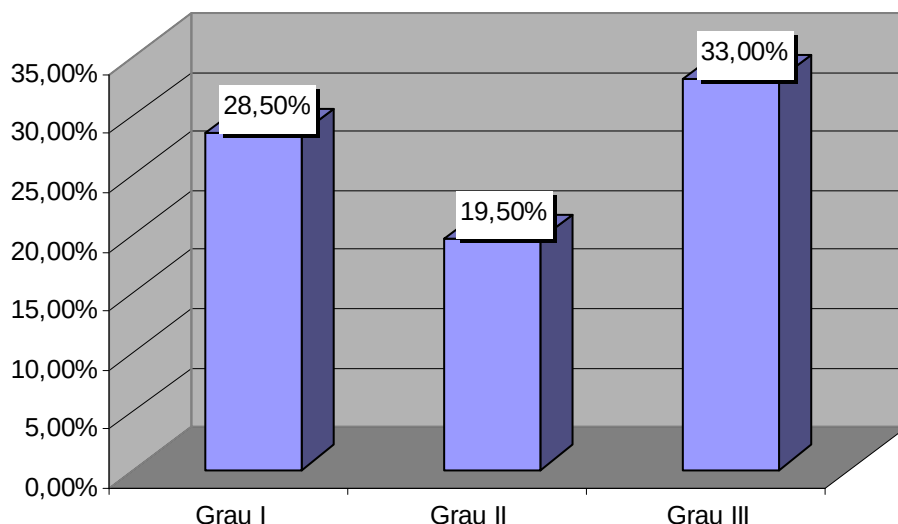


FIGURA 15: Percentual de células com marcação citoplasmática para COX-2 nos três graus do mastocitoma cutâneo canino, pela técnica de imunohistoquímica (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

TABELA 05: Medianas do percentual de células marcadas para o anticorpo primário anti-COX-2 nos três graus do MCT

Graduação histopatológica	Grau I	Grau II	Grau III	*P	**P	**r
	%	%	%			
Caspase-3	28,5 (12-45) a	19,5 (03-92) a	33,0 (2-86)a	0,0895	0,612	0,109

* Kruskal-Wallis posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).

** Correlação de Pearson.

* p mostra se há diferença entre os grupos.

**p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.

Letras minúsculas na mesma linha mostram correlação entre os graus.

Quando se avaliou a imunomarcação da COX-2, utilizando escores, a mediana dos escores (PCM) para COX-2 foi para tumores grau III, PCM = 3,00 (2,0-3,0), tumores grau II, PCM=1,50 (1,0-3,0), e tumores grau I, PCM=1,00 (0,0-2,0) (Tabela 6). Não houve diferença estatística entre a expressão da COX-2 nos diferentes graus histopatológicos (*p= 0,150), entretanto foi observada uma tendência entre o aumento da COX-2, conforme a

indiferenciação do tumor ($p^{**}=0,050$, $r= 0,398$). Nota-se ainda que o menor escore foi 0 no grau I (< 25% positividade do campo), 1, no grau II, e 2, no grau III, bem como o maior valor, 3 (> 75% positividade do campo), observado nos graus II e III, o que está de acordo com o aumento da expressão de COX-2 em tumores menos diferenciados.

TABELA 6:Medianas dos escores da expressão da COX-2 nos diferentes graus histopatológicos

Graduação histopatológica	Grau I %	Grau II %	Grau III %	*P	**P	**r
COX-2	1,0 (0,0-2,0)a	1,5 (1,0-3,0) a	3,0 (2,0-3,0)a	0,150	0,050	0,398

* *Kruskal-Wallis posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).*

** *Correlação de Pearson.*

* *p mostra se há diferença entre os grupos.*

***p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.*

Letras minúsculas na mesma linha mostram diferença entre os graus.

Os dados permitiram detectar correlação do aumento progressivo da COX-2, de acordo com a graduação histopatológica, assim, portanto pode-se inferir que, tanto o percentual de marcação positiva para COX-2, quanto os dados obtidos pelo escore (PCM), podem ser utilizados como possíveis indicadores prognósticos.

Heller et al. (2005), testaram em material de arquivo o anticorpo policlonal anti-PGHS imunoglobulina G (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI) com a técnica de imunoistoquímica, buscando identificar a expressão da COX-2 em algumas neoplasias caninas. Dentre elas, o hemangiossarcoma, sarcoma histiocítico e mastocitoma grau II. Todavia não conseguiram detectar a expressão da ciclooxigenase-2 nas neoplasias testadas.

A divergência entre os achados deste estudo com os dados encontrados por Heller et al. (2005), provavelmente, se dá devido à diferença na técnica utilizada, já que para obtenção da marcação positiva para COX-2 no mastocitoma canino foram realizadas recuperação antigênica e incubação com anticorpo primário “*overnight*”. Esses procedimentos foram dispensados por

Heller et al. (2005), já que não foi realizada a recuperação antigênica e o anticorpo primário foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente.

Cesar (2008) utilizando anticorpo monoclonal, estudou a expressão da cicloxigenase-2 no mastocitoma canino nos diferentes graus histopatológicos seguindo a classificação de Patnaik et al. (1984) e obteve percentual de marcação positiva semelhante aos dados obtidos por Calderón (2005), onde tumores bem diferenciados apresentavam alto percentual de marcação, cerca de 50% de marcação positiva. Esses dados apresentaram um percentual de marcação superior ao encontrado neste estudo, onde somente tumores indiferenciados (grau III) apresentaram mais de 50% de positividade. Apesar dos diferentes percentuais de marcação positiva descritos por Cesar (2008) e Calderón (2005) no mastocitoma canino, todos observaram que quanto maior a indiferenciação do tumor maior a expressão da COX-2, o que vem a corroborar os presentes achados.

De Nardi et al. (2007) compararam a expressão da COX-2 ao grau de diferenciação celular das neoplasias mamárias em cadelas e observaram que neoplasias benignas expressavam menos COX-2 do que neoplasias malignas, essas com altos percentuais de imunomarcação positiva (60,3%).

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que neoplasias menos diferenciadas tendem a expressar mais COX-2 que as bem diferenciadas, porém não se pode fazer correlação com o prognóstico.

A expressão da cicloxigenase-2 foi observada em todos os casos, pode-se, portanto, sugerir o uso de inibidores seletivos como terapia adjuvante no mastocitoma canino, independentemente do grau histopatológico do tumor. Na medicina veterinária existem relatos da imunomarcação positiva para COX-2 em tumores de cães, como osteossarcoma, carcinoma de bexiga, carcinoma renal, carcinoma de intestino, mastocitoma e câncer de mama, e em tumores de felinos como carcinoma de células de transição e carcinoma oral de células escamosas, todavia dentre os dados descritos, poucos relacionam a expressão da COX-2 ao grau de diferenciação celular (NASIR et al., 2000; KHAN et al., 2000; KHAN et al., 2001; BEAM et al, 2003; DORÉ e SIROIS, 2003; MCENTEE et al., 2002; HENRY, 2003; MULLINS et al., 2004; CALDERÓN, 2005; BERSANO, 2006; De NARDI et al., 2007, CESAR, 2008).

Os estudos em neoplasias de cães que correlacionaram a expressão da COX-2 ao grau de diferenciação celular observaram que as neoplasias benignas ou mais diferenciadas apresentam menor percentual de positividade em relação às malignas ou indiferenciadas (MCENTEE et al., 2003; DORÉ e SIROIS, 2003; CALDERÓN, 2005; De NARDI et al., 2007, CESAR, 2008).

A correlação do aumento gradativo da expressão da COX-2 de acordo com a progressão da indiferenciação histológica do mastocitoma cutâneo canino, está de acordo com a literatura consultada, que propõem que a COX-2 é uma enzima responsável pelo desenvolvimento e progressão dos tumores (BAUER et al., 2000; BAKHLE, 2001; MECNTEE et al., 2002; DORÉ et al., 2003; WANG & DUBOIS, 2004).

5.3.3. Correlação da expressão da COX-2 e caspase-3

Considerando-se que a inibição da apoptose é um dos mecanismos da ação da COX-2 mais estudados, avaliou-se a correlação da imunomarcação da COX-2 com a da caspase-3, já que esta apresenta um importante papel na via efetora da apoptose.

Nos casos estudados, foi observado que enquanto a expressão da COX-2 demonstrou aumento da sua expressão em relação ao grau I (28,5%) e o grau III(33,0%), o índice apoptótico diminuiu progressivamente, grau I (16,9 %), grau II (13,7 %) e grau III (12,4%) (Figura 16). Entretanto, não foi possível detectar correlação estatística.

Quando correlacionado o PCM da COX-2 e caspase-3, observamos que, no grau I, ambos demonstraram valores semelhantes, PCM COX-2 igual a 1,00 (0,0-2,0) e PCM caspase-3 igual a 1,00 (1,0-1,0), porém os demais graus apresentaram valores opostos. Enquanto a COX-2 aumentava sua expressão, de acordo com a indiferenciação tumoral, a expressão da caspase-3 diminuía, no grau II, PCM COX-2= 1,50 (1,0-3,0); PCM caspase-3= 0,50 (0,0-2,0), e grau III, PCM COX-2= 3,00 (2,0-3,0); PCM caspase-3 = 1,00 (0,0-1,5) (Figura 17).

Os valores das medianas de COX-2 e caspase-3 demonstraram que não há correlação estatística entre o PCM da COX-2 e do PCM da caspase-3

no grau I ($p=1,0$, $r=0,0$) ou no grau II ($p=0,105$, $r=-0,313$). Todavia no grau III observou-se correlação negativa ($p=0,001$, $r=-0,73$) (Tabela 7).

TABELA 7: Correlação entre os escores da imunomarcacão de COX-2 com a caspase-3

Graduação histopatológica	COX-2	Caspase-3
Grau I	1,0 (0,0-2,0) a	1,0 (1,0-1,0) a
Grau II	1,5 (1,0-3,0) a	0,5 (0,0-2,0) a
Grau III	3,0 (2,0-3,0) a	1,0 (0,0-1,5) b

Teste de Correlação de Pearson

Letras minúsculas na mesma linha mostram correlação entre a COX-2 e caspase-3.

Estudos que correlacionem a expressão da COX-2 e a caspase-3 em neoplasias caninas são escassos. Até o presente momento, não há relatos, na literatura consultada, que correlacionem a expressão da COX-2 e caspase-3 em mastocitomas caninos.

Bassani-Silva (2008) estudou a expressão de caspase-3 e COX-2 no tumor venéreo transmissível no cão e observou correlação estatística negativa entre os marcadores, dados semelhantes aos deste estudo, pois, onde havia altas expressões da COX-2 existia a diminuição da apoptose, evidenciada pela baixa positividade para caspase-3.

Fernandez-Martinez et al. (2006) utilizaram a técnica de TUNEL, cultura celular e imunocitoquímica e observaram que as células hepáticas humanas que expressam COX-2 tiveram redução na produção da caspase-3, corroborando a hipótese de a COX-2 ser responsável pela diminuição da caspase-3 e, conseqüentemente pela inibição da apoptose.

Segundo CAO e PRESCOTT (2002), o papel da COX-2 na inibição da apoptose é atribuído a dois mecanismos: produção de prostaglandinas que inibem a apoptose (como PGE₂), ou remoção de substrato pró-apoptótico, como o ácido araquidônico, que induz a morte celular programada, envolvendo a caspase-3 e a transição da permeabilidade mitocondrial.

Muitos estudos são desenvolvidos em neoplasias de humanos, na tentativa de compreender o mecanismo pelo qual a COX-2 estimula o desenvolvimento tumoral, e os dados obtidos no presente estudo é concordante com diversas pesquisas, que descrevem a correlação entre a expressão da COX-2 e a diminuição da expressão das caspases em neoplasias malignas em humanos e camundongos, como câncer de intestino, esôfago, fígado, pâncreas (GOWN e WILLINGHAM, 2002; SUN et al., 2002; FERREIRA e ROCHA, 2004; YU et al., 2005; FERNÁNDEZ-MARTINEZ et al., 2006; NISHIMURA et al., 2006; CALVIELLO et al., 2007; TESEI et al., 2007; CHUANG et al., 2008).

De NARDI (2007), ao avaliar a expressão da COX-2 e sua correlação com a caspase-3 em neoplasias da mama na cadela, observou resultados diferentes aos apresentados neste estudo, uma vez que, identificou correlação positiva entre a expressão da cicloxigenase-2 e a caspase-3, nos grupos de carcinoma primário metastático e nas metástases pulmonares.

Como a falha na apoptose é um evento de grande importância na progressão e resistência à terapia citotóxica dos antineoplásicos e principal mecanismo dos antiinflamatórios inibidores da cicloxigenase, avanços na compreensão dos eventos moleculares da apoptose demonstram que o uso dos inibidores seletivos para COX-2 ativam as caspases pela via intrínseca através da liberação do citocromo C proveniente da mitocôndria celular (SUN et al., 2002; LIU et al., 2005; FERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2006; TESEI et al., 2007).

Com base na correlação entre a COX-2 e os tumores grau III, sugerem-se novos estudos que avaliem se o uso de inibidores seletivos para COX-2 pode desencadear apoptose no mastocitoma canino, auxiliando, portanto, na terapia dessa neoplasia.

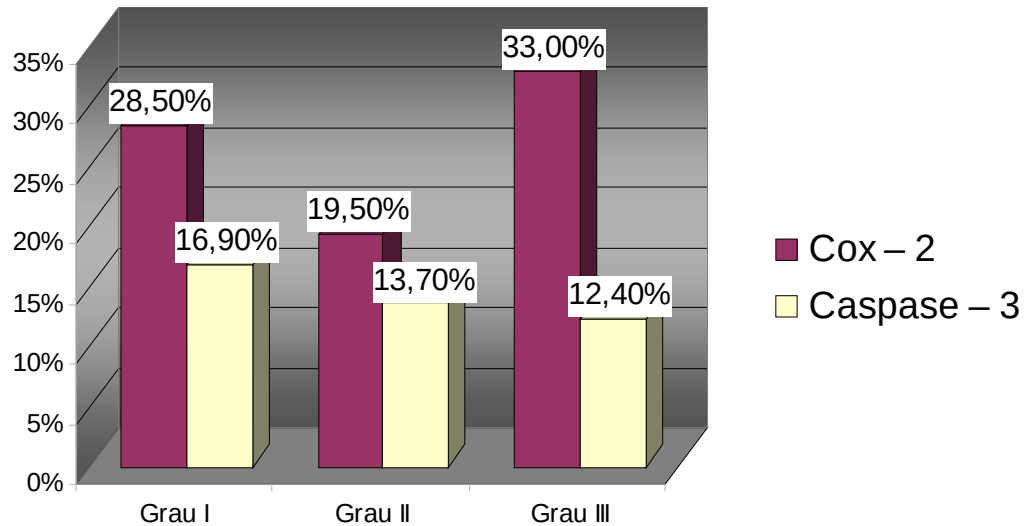


FIGURA 16: Percentual referente à contagem numérica de COX-2 e caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

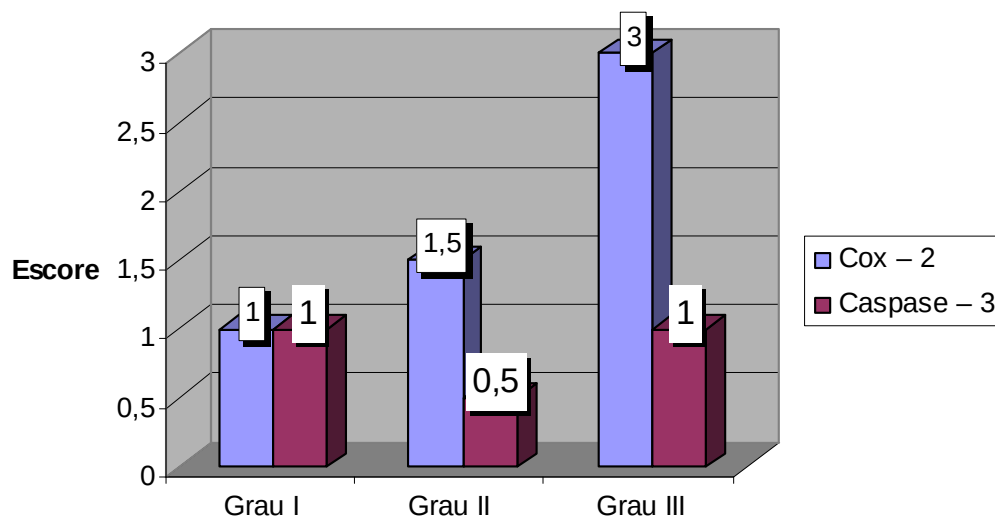
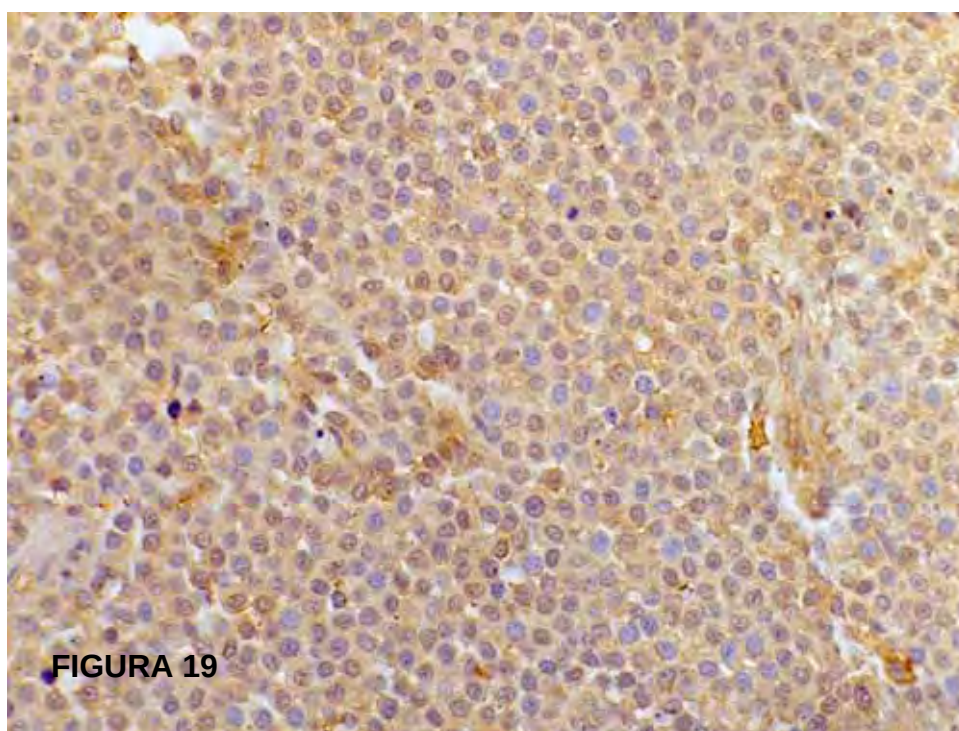
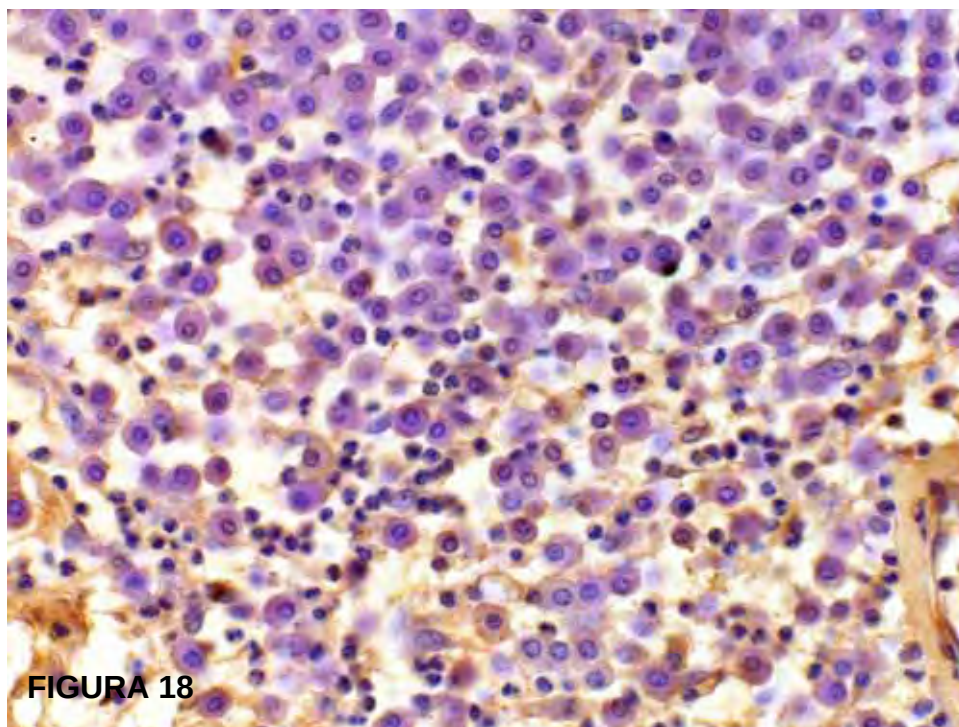


FIGURA 17: Escore referente à contagem numérica de COX-2 e caspase-3, nos diferentes graus de mastocitoma cutâneo canino (n=24), durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu

5.3.4. Avaliação da expressão de PGE2

A marcação de PGE2 nos mastócitos neoplásicos foi citoplasmática em todos os casos (Figuras 18, 19, 20).



(FIGURAS 18 e 19 legendas página seguinte)

FIGURA 18: Mastocitoma Grau I. Imunomarcacão positiva para PGE2, PCM=0 (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x).

FIGURA 19: Mastocitoma Grau II. Imunomarcacão positiva para PGE2, PCM=4 (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 20x).

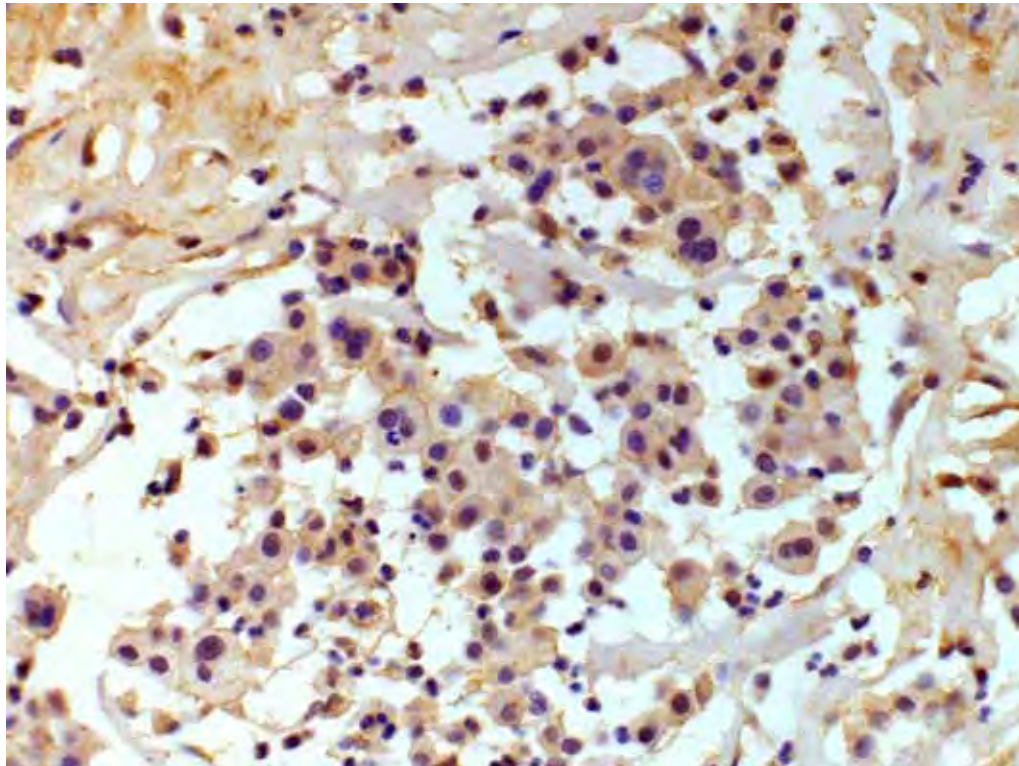


FIGURA 20: Mastocitoma Grau III. Imunomarcacão para PGE2, PCM=2. (Imunoistoquímica, PGE2, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 20x).

Quando se avalia a imunomarcacão da PGE2 utilizando escores, a mediana dos escores (PCM) para PGE2 foi para tumores grau III, PCM = 4,0 (4,0-4,0), tumores grau II, PCM=3,0 (3,0-4,0), e tumores grau I, PCM=2,5 (2,0-3,0) (Tabela 8). Esses dados demonstraram diferença estatística entre os escores de PGE2, quando correlacionados à graduação histopatológica ($p=0,009$), contudo, devido ao baixo número das amostras não foi possível identificar entre quais graus existe esta diferença (Tabela 8). Os dados

permitem, entretanto, observar uma tendência entre o aumento da PGE2 conforme a indiferenciação do tumor ($p^{**}=0,004$, $r=0,560$).

TABELA 8: Interação dos escores da expressão da PGE2 frente aos diferentes graus histopatológicos

Graduação histopatológica	Grau I	Grau II	Grau III	*P	**P	**r
PGE2	2,5 (2,0-3,0)a	3,0 (3,0-4,0)a	4,0 (4,0-4,0)a	0,009	0,004	0,560

* *Kruskal-Wallis, posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).*

** *Correlação de Pearson.*

* *p mostra se há diferença entre os grupos.*

***p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.*

Nota-se que a expressão da PGE2 é alta em todos os graus, pois ao avaliar a mediana dos valores dos tumores grau I, PCM=2,5 (2,0-3,0), tumores que apresentaram os menores percentuais de marcação positiva, a marcação foi superior a 26 - 50%.

Altas concentrações de PGE2 são produzidas por células tumorais, macrófagos associados a processos neoplásicos e monócitos. Em cães, a PGE2 foi observada em tumores como carcinoma de células de transição da bexiga, carcinoma oral de células escamosas e carcinoma prostático (MOHAMMED et al., 2004).

Com base na correlação do desenvolvimento e progressão do câncer da PGE2 descritas na literatura como mutação celular, atuação em eventos que promovem a proliferação e o crescimento tumoral, inibição da apoptose de células neoplásicas, imunossupressão do sistema imune do indivíduo para combater células neoplásicas e indução da angiogênese desde os estágios iniciais do desenvolvimento neoplásico (ROCCA et al., 1999; SOUZA et al., 2000; CAO e PRESCOTT, 2002; WANG e DUBOIS, 2004; HAYES, 2007), pode-se justificar o aumento da alta expressão de PGE2 no mastocitoma canino e sua correlação à graduação histopatológica, já que o aumento da expressão de PGE2 acompanha o potencial maligno da neoplasia, contribuindo dessa forma com um comportamento biológico mais agressivo e, portanto, um prognóstico mais reservado.

Baseado na diferença estatística dos escores de marcação para PGE2 podemos inferir que o percentual de células marcadas avaliado pelos escores (PCM) para PGE2 pode ser utilizado como um possível indicador prognóstico, já que seu aumento foi progressivo quando correlacionados aos graus histopatológicos.

Este corrobora com os descritos por PINCZOWSKI (2007), que utilizando um maior número de amostras, identificou diferença na expressão da PGE2 entre os graus I e III.

Outro fato que deve ser levado em consideração é que a inibição de prostaglandinas, especialmente PGE2, é ainda um dos mecanismos mais aceitos para as drogas antiinflamatórias, isso auxilia na justificativa dos resultados alcançados por TAKAHASHI et al. (1997) que descrevem a ação de corticóides no mastocitoma canino. Entretanto a inibição indiscriminada das prostaglandinas causa efeitos colaterais como, por exemplo, distúrbios renais e gastrointestinais (CRYER e FELDMAN, 1998; VANE e BOTTING, 1998; TAYLOR, 1999), levando, à estudos que direcionem à tratamentos com menores efeitos colaterais.

5.3.5. Correlação da expressão da COX-2 e PGE2

A PGE2 é um dos metabólitos do ácido araquidônico produzido pelas COX-1 e COX-2 (MASFERRER et al., 2000), e muitos estudos têm demonstrado grande interesse na descoberta da interação entre a COX e a PGE2, no mecanismo do desenvolvimento e progressão do câncer (LUPULESCU et al., 1996; ARA et al., 1996).

Fundamentados na literatura, correlacionamos as medianas dos dados obtidos da imunomarcação da COX-2 e PGE2, onde a mediana para o PCM da COX-2 foi 1,0 (0,0-2,0) para o grau I; 1,5 (1,0-3,0) para o grau II e 3,0 (2,0-3,0) para o grau III, já a mediana da PGE2 foi PCM 2,5 (2,0-3,0) para o grau I; 3,0 (3,0-4,0) para o grau II e 4,0 (4,0-4,0) para o grau III (Figura 21). Não houve correlação entre a COX-2 e PGE2 no grau I ($p=1,0$, $r=0,0$), porém foi possível observar correlação positiva entre COX-2 e PGE2 nos grau II ($p=0,003$, $r=0,541$) e III ($p<0,001$, $r=0,845$) (Tabela 9).

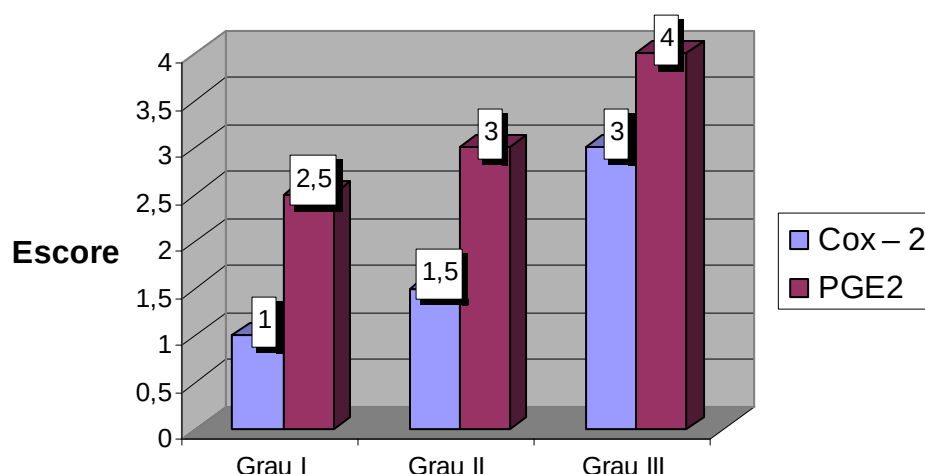


FIGURA 21: Correlação dos escores de percentual de marcação (PCM) entre COX-2 e PGE2, durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu

TABELA 9: Análise estatística da correlação entre os escores da imunomarcacão de COX-2 com PGE2

Graduação histopatológica	COX-2	PGE2
Grau I	1,0 (0,0-2,0) a	2,5 (2,0-3,0) a
Grau II	1,5 (1,0-3,0) a	3,0 (3,0-4,0) b
Grau III	3,0 (2,0-3,0) a	4,0 (4,0-4,0) b

Teste de Correlação de Pearson

Letras minúsculas na mesma linha mostram correlação entre a COX-2 e PGE2.

A cicloxigenase-2 ainda conserva grande papel na carcinogênese, e há descrição que a concentração da PGE2 pode estar aumentada em células com super expressão da COX-2, pois a PGE2 é considerada seu efector de maior importância (MOHAMMED et al., 2004; MÉRIC et al., 2006).

Apesar de não ter sido observada correlação estatística entre os escores (PCM) da imunomarcacão da COX-2 e PGE2 no grau I, ao observarmos a média dos escores (PCM) da COX-2 e PGE2, nos diferentes graus, notamos um aumento progressivo de ambas, e maior percentual da expressão da PGE2 em relação à expressão da COX-2.

A correlação positiva entre COX-2 e PGE2 nos graus II e III permite concordar com MÉRIC et al. (2006) pois de fato a COX-2 ou a PGE2 atuam juntas ou sinergicamente, induzindo ou promovendo o crescimento tumoral e inibindo a apoptose.

5.3.6. Avaliação da expressão de VEGF

A imunomarcção do VEGF no mastocitoma foi citoplasmática em todos os mastócitos neoplásicos, ainda havendo marcação em estroma e células endoteliais (Figuras 22, 23 e 24). A mediana do percentual de células marcadas para VEGF foi igual em todos os graus, PCM= 4,0 (4,0-4,0), sem diferença estatística nos diferentes graus histopatológicos ($p=1,0$), ou correlação entre sua expressão e a graduação histopatológica (Tabela 10).

Dados similares ao deste estudo foram observados por Rebbuzzi et al. (2007) e PINCZOWSKI (2008), onde todos os mastocitomas independentemente do grau, expressam VEGF. Rebbuzzi et al. (2007) acrescentam, ainda que, após sua correlação com a graduação histopatológica segundo Patnaik et al. (1984) somente houve variação na intensidade entre os graus II e III em relação ao grau I.

Alguns estudos em neoplasias humanas objetivaram identificar a expressão do VEGF e associá-la ao estadiamento clínico ou prognóstico (CONNOLLY et al., 1989; DE JONG et al., 1998; ACHEN et al., 1998; ADAMS et al., 2000; PANAYIOTIS et al., 2005; LETCHOUMY et al., 2005). Na medicina veterinária expressão do VEGF ainda é pouco estudada, mas já existem relatos em neoplasias de cães e gatos, como no mastocitoma, neoplasia mamária, seminoma e linfoma (RESTUCCI et al., 2000; RESTUCCI et al., 2003; REBUZZI et al., 2006; MILLANTA et al., 2006; RODIGHIERI, 2008).

RODIGHIERI (2008), estudando linfomas caninos, observou altos percentuais de marcação para VEGF.

MILLANTA et al. (2006) relataram que, em neoplasias mamárias da cadela e da gata, havia correlação entre o aumento da expressão e a indiferenciação tumoral, todavia o percentual de expressão de VEGF não estava associado ao estadiamento clínico ou sobrevida do animal.

Estudos em humanos demonstraram que pacientes humanos com neoplasias indiferenciadas apresentam altos níveis séricos de VEGF e foram associados ao estágio tumoral, demonstrando pior prognóstico (DE JONG et al., 1998; ACHEN et al., 1998; ADAMS et al., 2000). Esses dados podem ser considerados nas presentes observações, com base nos altos percentuais de VEGF no mastocitoma, e, portanto, alto potencial de malignidade dessa neoplasia, mesmo nos graus moderadamente ou bem diferenciados.

PANAYIOSTIS et al. (2005) também observaram alto percentual de marcação de VEGF em carcinoma de células escamosas em humanos, como neste estudo com cães, porém, ao associá-lo ao estadiamento clínico e sobrevida, notou que o VEGF não deve ser utilizado como indicador prognóstico. Isso leva a inferir que, apesar dos altos percentuais encontrados em neste estudo no mastocitoma, esse marcador não é o mais indicado para determinar o prognóstico, considerando-o de forma isolada.

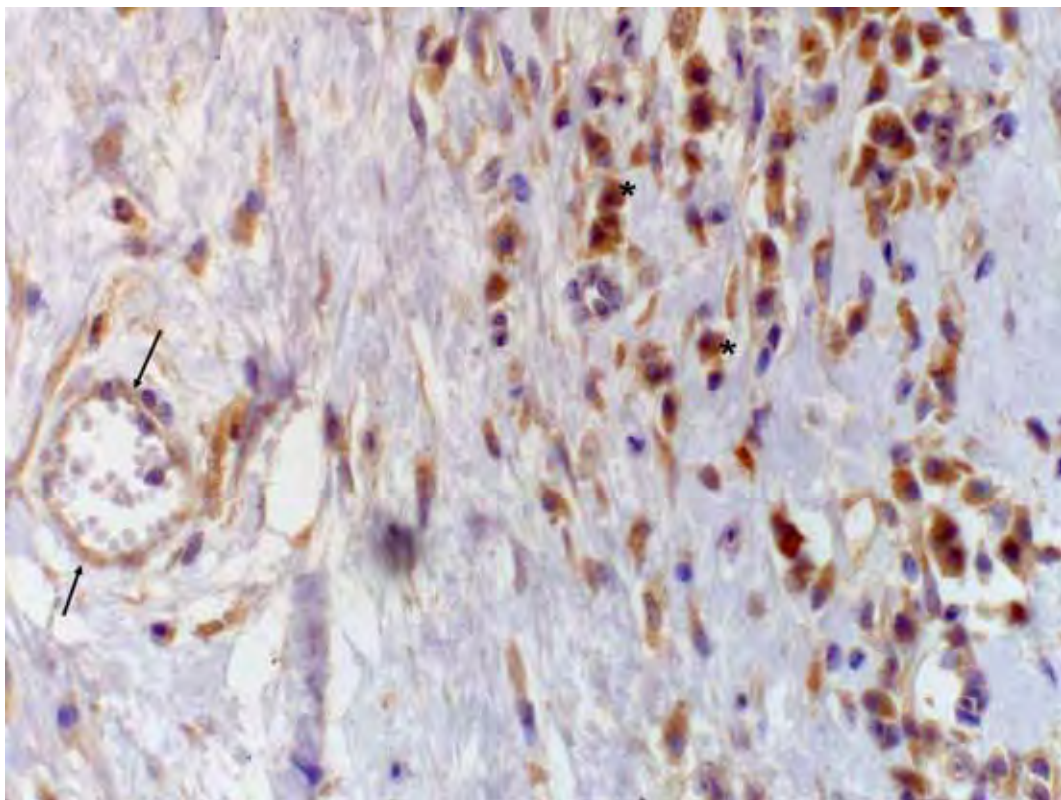
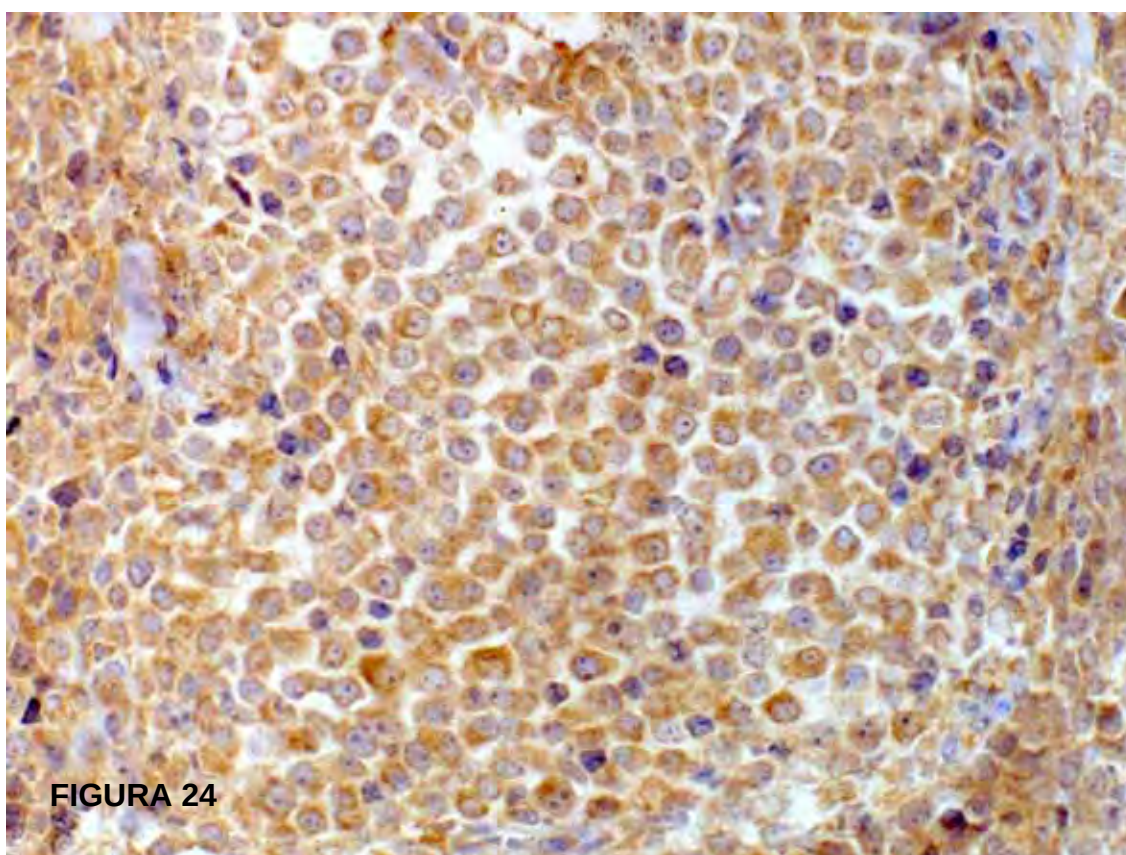
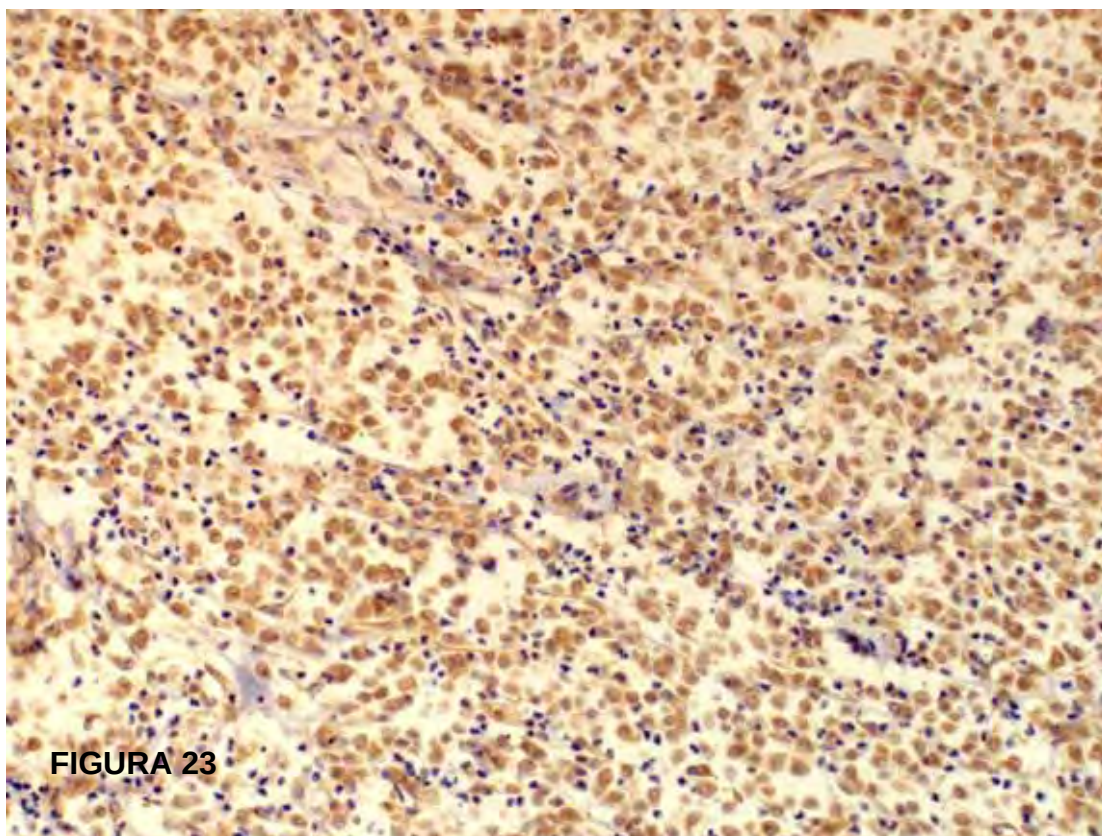


FIGURA 22: Mastocitoma Grau I. Imunomarcção positiva para VEGF, PCM=4. Marcação em mastócitos (*) e endotélio (seta) (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x)



(FIGURAS 23 e 24 legenda na página seguinte)

FIGURA 23: Mastocitoma Grau II, PCM=4 (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 20x)

FIGURA 24: Mastocitoma Grau III, PCM=4 (Imunoistoquímica, VEGF, Envision, DAB, contra coloração Hematoxilina de Harris, Obj 40x)

TABELA 10: Mediana dos escores da imunomarcção de VEGF nos três diferentes graus do mastocitoma canino

Graduação histopatológica	Grau I	Grau II	Grau III	*P	**P	**r
VEGF	4,0 (4,0-4,0)a	4,0 (4,0-4,0)a	4,0 (4,0-4,0)a	1,000	-	-

* *Kruskal-Wallis posteriormente avaliados pelo teste de Dunn, os valores foram expressos como mediana (IQ25-IQ75).*

** *Correlação de Pearson.*

* *p mostra se há diferença entre os grupos.*

***p mostra a correlação entre a expressão nos diferentes graus.*

- *não foi possível realizar estudo estatístico.*

Letras minúsculas na mesma linha mostram a diferença entre os graus.

5.3.7. Correlação da expressão da COX-2 e VEGF

Com o intuito de observar possível sinergismo entre a imunomarcção de COX-2 e VEGF, as medianas foram correlacionadas e observou-se correlação positiva nos grau II ($p < 0,001$, $r = 0,772$) e III ($p < 0,001$, $r = 0,750$), já no grau I não foi possível observar tal correlação (Figura 25 e Tabela 11).

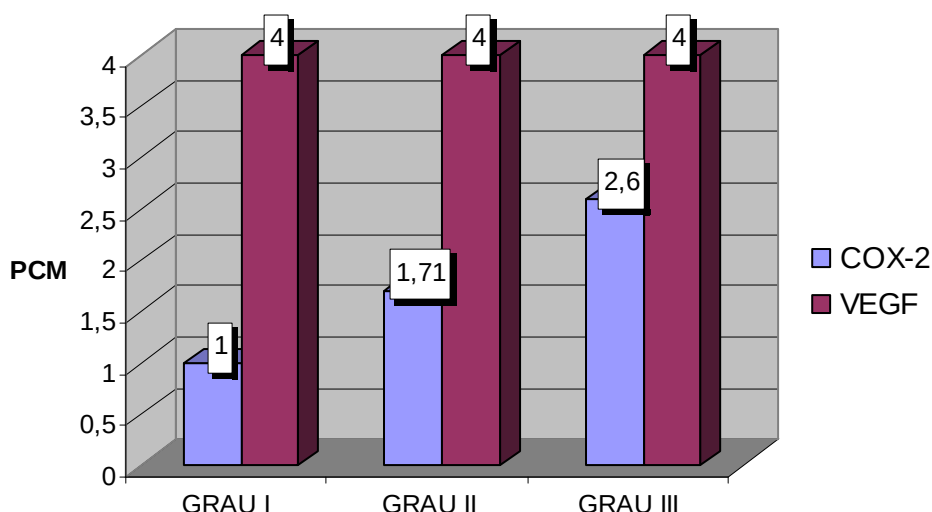


FIGURA 25: Correlação do percentual de marcação (PCM) entre COX-2 e VEGF, durante os anos de 2004 a 2007, na FMVZ - UNESP, Botucatu.

TABELA 11: Correlação entre os escores da imunomarcação de COX-2 com VEGF, nos mastocitomas cutâneos caninos

Graduação histopatológica	COX-2	VEGF
Grau I	1,0 (0,0-2,0) a	4,0 (4,0-4,0) a
Grau II	1,5 (1,0-3,0) a	4,0 (4,0-4,0) b
Grau III	3,0 (2,0-3,0) a	4,0 (4,0-4,0) b

* *Teste de Correlação de Pearson*

* *letras minúsculas mostram correlação entre a COX-2 e VEGF.*

O papel da COX-2 na carcinogênese tem sido bastante descrito e muitos mecanismos são propostos para explicar como o aumento da COX-2 contribui para o desenvolvimento tumoral, dentre eles o estímulo à angiogênese pela ação do fator de crescimento endotelial vascular que é o mais descrito (CAO e PRESCOTT, 2002; EIBL et al.,2003; FUKUDA et al., 2003; TAMURA et al.,2006; HAYES, 2007; MA, 2007). Esse fato foi observado nos mastocitomas caninos moderadamente e indiferenciados.

Observou-se no mastocitoma marcação positiva para COX-2 em vasos sanguíneos. Alguns estudos igualmente descrevem essa marcação, dentre eles, um estudo retrospectivo com mais de 100 amostras de neoplasias de humanos. Avaliando expressão da COX-2 observou que os vasos sanguíneos presentes nas neoplasias expressavam a cicloxigenase-2 e sugeriram que esse tipo de observação poderia indicar que essa enzima está envolvida na angiogênese tumoral (MASFERRER et al., 2000; PRESCOTT, 2000).

Os dados obtidos da correlação entre a COX-2 e VEGF no mastocitoma canino sugerem que provavelmente o mecanismo que desencadeia o estímulo da produção do VEGF pode estar correlacionado com a expressão da COX-2. Não há estudo da correlação entre a COX-2 e o VEGF até o presente momento no cão, entretanto em neoplasias humanas como câncer de pâncreas, pulmão e carcinoma de esôfago foi descrita correlação entre a expressão desses marcadores ou seus metabólitos (EIBL et al., 2003 MA, 2007).

Deve-se ainda ressaltar que, neste estudo observou-se correlação entre a COX-2 e a alta expressão de seu metabólito PGE₂, esta, porém, quando derivada da COX-2, é produzida em altas quantidades nos tumores e tem sido associada à indução da angiogênese tumoral mesmo nos estágios iniciais do desenvolvimento tumoral e regulação do sistema imune (ROCCA et al., 1999; MASFERRER et al., 2000; WANG e DUBOIS, 2004; HAYES, 2007).

MITSUTOSHI et al. (2006) relataram que a PGE₂ produzida pela via da COX-2 induz a expressão de VEGF. Isso nos leva a inferir que, no mastocitoma a PGE₂ e a COX-2 estão ligadas à indução da angiogênese tumoral, em parte pela ação de VEGF, principalmente nos tumores grau II e III.

Muitas drogas antiangiogênicas e inibidores seletivos para a cicloxigenase-2 estão sendo desenvolvidas. Algumas neoplasias humanas já demonstraram que essas terapias podem ser efetivas no combate ao câncer, contudo, na medicina veterinária, existem poucos estudos com drogas antiinflamatórias não esteroidais e não há estudos com drogas antiangiogênicas associadas à ação antineoplásica (MASFERRER et al., 2000; PRESCOTT, 2000; CAO e PRESCOTT, 2002; MERIC et al., 2006; HAYES, 2007). Com base na identificação desses marcadores no mastocitoma canino, seria interessante buscar novas alternativas para terapias adjuvantes, uma vez

que seria uma possibilidade para obter aumento no tempo de sobrevivência de muitos animais.

5.3.8. Correlação da expressão da COX-2 , PGE2, VEGF e caspase-3

A figura 26 ilustra os escores de imunomarcação de COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3.

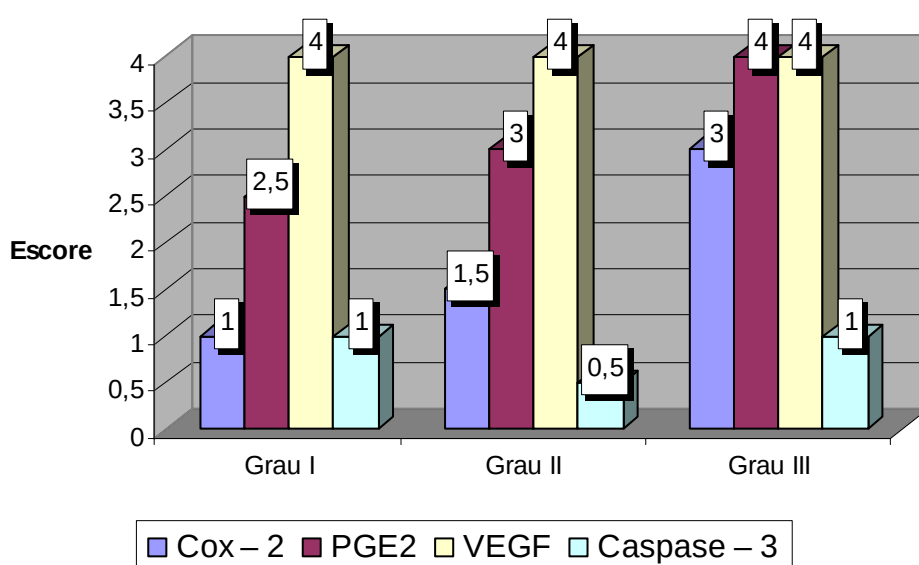


FIGURA 26: Distribuição da expressão do percentual de marcação (PCM) de COX-2, PGE2, VEGF e caspase-3, durante os anos de 2004 a 2007 na FMVZ - UNESP, Botucatu

A literatura descreve que a PGE2 é um dos principais metabólitos da COX-2 (ROCCA et al., 1999; BAKHLE, 2001; MCENTEE et al., 2002). Esta pesquisadora observou que a PGE2 como produto do metabolismo da COX-2, teve seu aumento proporcional ao da COX-2 nos mastocitomas caninos, sendo que ambas apresentaram tendência em aumentar sua expressão de acordo com a indiferenciação tumoral. Infere-se portanto que no mastocitoma a PGE2 provavelmente é induzida pela COX-2.

Não há dados quanto à expressão da COX-2 ou PGE2 no mastócito normal, ou presente na reação inflamatória em cães, porém Abdel-Majid et al. (2004) observaram em cultura de mastócitos humanos, que a PGE2 é um importante mediador inflamatório, e o maior indutor da potente isoforma proangiogênica VEGF-A. Sabe-se também que o mastócito normal em várias espécies pode expressar e liberar VEGF, sob certas circunstâncias, e que o VEGF derivado de mastócitos está envolvido na regulação da cicatrização e angiogênese (REBUZZI et al., 2007).

Como no mastocitoma os altos valores de VEGF foram correlacionados à expressão da COX-2, talvez o mastócito normal também expresse COX-2 e PGE2, já que essas enzimas estão relacionadas ao processo inflamatório e cicatrização.

Os mecanismos pelos quais a PGE2 estimula o VEGF ainda continuam indefinidos, no entanto Eibl et al. (2003) sugerem que o ácido araquidônico é convertido em PGE2 através da ação específica da COX-2, aumenta os níveis de VEGF, de forma autócrina e parácrina, estimulando a migração de células endoteliais.

Alguns autores descrevem uma íntima relação entre VEGF, COX-2 e prostaglandinas, como PGE2, e correlação positiva entre a expressão de VEGF e COX-2, com a densidade microvascular e angiogênese (CIANCHI et al., 2001; GALLO et al., 2001).

A ação da PGE2 na angiogênese tumoral tem sido descrita como um dos mecanismos pelos quais a COX-2 estimula o VEGF (WANG e DUBOIS, 2004). Observou-se que o mastocitoma apresenta alta expressão de VEGF, independentemente do grau de diferenciação do tumor (REBUZZI et al., 2007). Como é descrito que o mastócito normal expressa PGE2 (ABDEL-MAJID et al., 2004) e VEGF (REBUZZI et al., 2007), infere-se que, no processo neoplásico, esses valores podem aumentar consideravelmente. A célula neoplásica pode apresentar uma superexpressão da COX-2, PGE2 e VEGF, conferindo um alto potencial maligno para essa neoplasia.

Notou-se, ainda, que, no mastocitoma, diferente de outras neoplasias, a COX-2 não parece estar envolvida diretamente na inibição da apoptose, provavelmente devido aos altos valores de VEGF e subsequente aumento da angiogênese tumoral. Preziosi et al. (2004) descrevem que os mastocitomas

tendem a ter maior número de vasos sanguíneos, de acordo com a indiferenciação tumoral. Isso permitiria que as células neoplásicas recebessem oxigênio e nutrientes em quantidades suficientes para atender seu metabolismo celular e não iniciarem o processo de apoptose.

Frente aos resultados apresentados, do aumento da imunomarcagem de COX-2, PGE2, diminuição da caspase-3 acompanhando a indiferenciação do tumor, e valores constantes na marcação de VEGF, esta pesquisadora sugere o uso na rotina clínica oncológica de drogas inibidoras seletivas da COX-2 e inibidores angiogênicos, independentemente do grau de diferenciação histopatológica do tumor.

Uma maior amostragem de tumores seria interessante, especialmente os bem diferenciados, bem como a correlação desses biomarcadores com a evolução clínica dos pacientes.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- O mastocitoma expressa COX-2 e sua imunomarcagem é alta nos três graus histopatológicos, sendo que essa elevação tende a ser correspondente à indiferenciação tumoral,
- O mastocitoma expressa PGE2 e sua imunomarcagem é alta nos três graus histopatológicos, sendo que essa elevação tende a ser correspondente à indiferenciação tumoral,
- A imunomarcagem de PGE2 pode ser correlacionada à expressão da COX-2 nos graus II e III, o que sugere que essa enzima é produzida no mastocitoma pela via da ciclooxigenase-2,
- O mastocitoma expressa VEGF e sua imunomarcagem é alta nos três graus histopatológicos, independentemente da indiferenciação tumoral,

- A imunomarcção de VEGF pode ser correlacionada à expressão da COX-2 nos graus II e III o que sugere uma possível estimulação à angiogenese pela via da cicloxigenase-2,
- O mastocitoma canino expressa caspase-3 e sua expressão é baixa, independentemente do grau histopatológico,
- A imunomarcção da caspase-3 não pôde ser correlacionada à expressão da COX-2 nos diferentes graus histopatológicos o que sugere que no mastocitoma a COX-2 não é responsável pela inibição da apoptose,
- O mastocitoma canino é uma neoplasia potencialmente maligna, independentemente do grau histopatológico, pelo baixo índice apoptótico, elevados níveis de COX-2, PGE2 e VEGF.

7. REFERÊNCIAS ¹

¹ ABNT – Normas de Referências, 2003.

Abadie, J. J., M. A. Amardeilh, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. J Am Vet Med Assoc, v.215, n.11, Dec 1, p.1629-34. 1999.

Abdel-Majid, R.M.; Marshall J.S. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. The Journal of Immunology. v 172 p 1227-36, 2004.

Achen, C. et al. Vascular endothelial growth factor D (VEGF D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (flk1) and VEGF receptor 3 (flt4). Proc Natl Acad Sci USA v. 95, p. 548-53, 1998.

Adams J. M., Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. Genes and Development, vol 17, p.2481-2495, 2003.

Almeida, E.M.P., et al., Expression of Cyclo-oxygenase in Naturally Occurring Squamous Cell Carcinomas in Dogs. The journal of histochemistry e cytochemistry, v.49, p.867-75, 2001.

Ara, G.; TEICHER, B.A. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors in cancer therapy. Prostaglandins, Leukot Esset Fatty Acids, v. 54: p 3-16, 1996.

Ayl, R.D. et al, Correlation of DNA ploidy to tumor histologic grade, clinical variables, and survival in dogs with mast cell tumors. Veterinary Pathology, v.29: p 386-390, 1992.

Bakhle, Y. S. COX-2 and cancer: a new approach to an old problem. Br J Pharmacol, v.134, n.6, Nov, p.1137-50. 2001.

Bassani-Silva, S., Biomarcadores e citogenética no tumor venéreo transmissível natural do cão. 2008. 72 p. Tese (Doutorado em Medicina

Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista,. Botucatu.

Bauer, A. K., L. D. Dwyer-Nield, et al. High cyclooxygenase 1 (COX-1) and cyclooxygenase 2 (COX-2) contents in mouse lung tumors. *Carcinogenesis*, v.21, n.4, Apr, p.543-50. 2000.

Beam, S. L., K. M. Rassnick, et al. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Vet Pathol*, v.40, n.5, Sep, p.496-500. 2003.

Bol, D. K., R. B. Rowley, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression in the skin of transgenic mice results in suppression of tumor development. *Cancer Res*, v.62, n.9, May 1, p.2516-21. 2002.

Bostock, D. E. The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract*, v.14, n.1, Jan, p.27-41. 1973.

Bostock, D. E., J. Crocker, et al. Nucleolar organiser regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer*, v.59, n.6, Jun, p.915-8. 1989.

Brown, J. M. e B. G. Wouters. Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res*, v.59, n.7, Apr 1, p.1391-9. 1999.

Calderón, C. Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia, histoquímica e imunoistoquímica, 2005. 106p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista,. Botucatu.

Calderón, C., Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e do índice de proliferação celular dos mastocitomas cutâneos caninos pela histopatologia,

histoquímica e imunoistoquímica, Botucatu, 106p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, 2005.

Calviello, G., et al., Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of b-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis*, vol.28, n.6 p.1202–1209, 2007.

Cao, Y. e S. M. Prescott. Many actions of cyclooxygenase-2 in cellular dynamics and in cancer. *J Cell Physiol*, v.190, n.3, Mar, p.279-86. 2002.

Cesar, J. R. F. Avaliação da expressão da cicloxigenase 2 e de macrófagos em diferentes graus histológicos de mastocitoma canino. 2008. 59f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Chen X., et al., Aberrant arachidonic acid metabolism in esophageal adenocarcinogenesis, and the effect of sulindac, nordihidroguaiaretic acid, and alfa-deifluoromethylornithyne on tumorigenesis in a rat surgical model. *Carcinogenesis*, v.23, p.2095-102, 2002.

Costa, C., R. Soares, et al. Cyclo-oxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J Clin Pathol*, v.55, n.6, Jun, p.429-34. 2002.

Cryer, B. e M. Feldman. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*, v.104, n.5, May, p.413-21. 1998.

De Jong, J.S.; Van Diest P.J.; Van der Valk P. Baak J.P. Expression of growth factors, growth inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II. Correlations with proliferation and angiogenesis. *Journal of Pathology* v. 184, p. 53-57, 1998.

De Nardi, A. B. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, p53 e caspase nas neoplasias de mama em cadelas. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

De Nardi, A. B. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, p53 e caspase nas neoplasias de mama em cadelas. 2007. 92p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, 2007.

De Nardi, A. B.; Daleck, R. C.; Amorim, R. L. et al. Inmunoexpresión de la ciclooxigenasa-2 en las neoplasias mamarias en perras. *Selecciones Veterinárias.*, v 15 p.9-13, 2007.

Degterev, A., M. Boyce, et al. A decade of caspases. *Oncogene*, v.22, n.53, Nov 24, p.8543-67. 2003.

Dong, M., K. Guda, et al. Inverse association between phospholipase A2 and COX-2 expression during mouse colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, v.24, n.2, Feb, p.307-15. 2003.

Doré, M., I. Lanthier, et al. Cyclooxygenase-2 expression in canine mammary tumors. *Vet Pathol*, v.40, n.2, Mar, p.207-12. 2003.

Dubois, R. N., et al., Cyclooxygenase in biology and disease. *The FASEB Journal*, v.12, p 1063- 1073, 1998.

Dubois, R. N., S. B. Abramson, et al. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, v.12, n.12, Sep, p.1063-73. 1998.

Earnest, D. L., L. J. Hixson, et al. Piroxicam and other cyclooxygenase inhibitors: potential for cancer chemoprevention. *J Cell Biochem Suppl*, v.161, p.156-66. 1992.

Eberhart, C. E., R. J. Coffey, et al. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, v.107, n.4, Oct, p.1183-8. 1994.

Eiibl, G.; Bruemmer D.; OKADA Y. et al. PGE2 is generated by specific COX2 activity and increases VEGF production in COX2 expressing human pancreatic cancer cells. *Biochem and Biophy Res Comm.* v 306, p 887-897, 2003.

Fan, T. M.; Lorimier e L. P. Treatment options for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Medicine.* v. 100 n. 4, p. 272-284, 2005.

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

Fernández-Martínez, A., et al., Cyclo-oxygenase 2 expression impairs serum-withdrawal-induced apoptosis in liver cells. *Biochemical Journal.* V. 398, p.371-380, 2006.

Folkman, J., et al., Angiogenic factors. *Science*, v. 235, p. 442-447, 1997

Fox, L.E., Mast cell Tumors. In: MORRISON W.B. (Eds). *Cancer In dogs and cats: medical and surgical management*, Pennsylvania: Willian e Wilkins, 1998. p.477-85.

Gallo, O. et al. Cyclooxygenase-2 pathways correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia*, v 3, p 53-61, 2001.

Gargett, C.E. e Rogers, P.A. Human endometrial angiogenesis. *Reproduction*, v 121, p 181-86, 2001.

Garrido, C. e G. Kroemer. Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Curr Opin Cell Biol*, v.16, n.6, Dec, p.639-46. 2004.

Gown, A. M. ; Willingham, M. C. Improved detection of apoptotic cells in Archival paraffin sections: Immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase-3. The journal of histochemistry & cytochemistry., v. 50 p. 449-454, 2002.

Gross, T.L., et al., Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis. Oxford: Blackwell, 932p. 2005.

Hayes, A.. Cancer, cyclo-oxygenase and nonsteroidal anti-inflammatory drugs – can we combine all three?. Veterinary and Comparative Oncology, v.5, n.1, p.1–13, 2007.

Heller, D. A. et al., Cyclooxygenase-2 expression is associated with histologic tumor type in canine mammary carcinoma. Veterinary Pathology, v, 42, n. 6, p. 776-780, 2005.

Henry, C. J. Management of transitional cell carcinoma. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.33, n.3, May, p.597-613. 2003.

Hottendorf, G. H. e S. W. Nielsen. Pathologic report of 29 necropsies on dogs with mastocytoma. Pathol Vet, v.5, n.2, p.102-21. 1968.

Hsu, S. M.; Raine, L; Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled (PAP) procedures, J. Histochem. Cytochem., n.29, p. 577-580, 1981.

Jaffe, M. H., G. Hosgood, et al. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. Vet Pathol, v.37, n.1, Jan, p.40-6. 2000.

Kawamori, T., C. V. Rao, et al. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis. Cancer Res, v.58, n.3, Feb 1, p.409-12. 1998.

Kelly, L. M., A. D. Hill, et al. Lack of prognostic effect of Cox-2 expression in primary breast cancer on short-term follow-up. *Eur J Surg Oncol*, v.29, n.9, Nov, p.707-10. 2003.

Khan, K. N., D. W. Knapp, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res*, v.61, n.5, May, p.478-81. 2000.

Khan, K. N., K. M. Stanfield, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in canine renal cell carcinoma. *Vet Pathol*, v.38, n.1, Jan, p.116-9. 2001.

Kiupel, M. et al., The use of KIT and tryptase expression patterns as prognostic tools for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology*, v.41, p. 371-377, 2004.

Knapp, D.W., et al. Naturally occurring canine transitional cell carcinoma of the urinary bladder. A relevant model of human invasive bladder cancer. *Urology Oncology*, v. 5, p. 47-59, 2000.

Kulkarni, S., J. S. Rader, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res*, v.7, n.2, Feb, p.429-34. 2001.

Letchoumy, P. V., et al., Comparative evaluation of antiproliferative, antiangiogenic and apoptosis inducing potential of black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. *Journal of Carcinogenesis*, v.6, n. 19, p. 1-13, 2007.

Leung, D.W. e Cachianes, G.; Kuang W.J. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. v 246 p. 1306-9, 1989.

Liu, X. H. e D. P. Rose. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer Res*, v.56, n.22, Nov 15, p.5125-7. 1996.

London, C. A. e B. Seguin. Mast cell tumors in the dog. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.33, n.3, May, p.473-89, v. 2003.

Loro, L. L., O. K. Vintermyr, et al. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. J Oral Pathol Med, v.32, n.3, Mar, p.125-38. 2003.

Lupulescu, A. Prostaglandins, their inhibitors and cancer. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, v.54, n.2, Feb, p.83-94. 1996.

Luz, M. R., M. D. Cesario, et al. Canine corpus luteum regression: apoptosis and caspase-3 activity. Theriogenology, v.66, n.6-7, Oct, p.1448-53. 2006.

Ma, H. Comment: COX-2 and VEGF inhibitors could be considered as a clinical and prevntion on the esophageal carcinoma. Life Science Journal., v. 4, p 8-10, 2007.

Mao, H., Z. Li, et al. HSP72 attenuates renal tubular cell apoptosis and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. Am J Physiol Renal Physiol, v.295, n.1, Jul, p.F202-14. 2008.

Masferrer, J. L., K. M. Leahy, et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. Cancer Res, v.60, n.5, Mar 1, p.1306-11. 2000.

Mcentee, M. F., J. M. Cates, et al. Cyclooxygenase-2 expression in spontaneous intestinal neoplasia of domestic dogs. Vet Pathol, v.39, n.4, Jul, p.428-36. 2002.

Méric, J. ; Rottey, S.; Olausson, K. et al. Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. Oncology Hematology, v. 59, p 51-54, 2006.

Meyers, M. O. e Watson, J. C. Angiogenesis and hepatic colorectal metastases. Surgical Oncology Clinics of North America, v. 12, p 151-163, 2003.

Millanta, G.; Silvestri, G.; Vaselli, C et al. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1KDR in promoting tumour angiogenesis feline and canine mammary carcinomas: a preliminary study of autocrine and paracrine loops, v. 81, p. 350-357, 2006.

Mitsutoshi, et al., Vascular Endothelial growth factor up-regulates Cyclooxygenase-2 expression in human endothelial cells. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v 87 (7), p 3504-07, 2002.

Mohammed, S.I. et al., Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-

Mohammed, S.I. et al., Prostaglandin E2 concentrations in naturally occurring canine cancer. Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids, v. 64, p. 1-4, 2001.

Moscatelli, D.; et al., D. Angiogenic factors stimulate plasminogen activator and collagenase production by capillary endothelial cell. Journal of cellular Biology, v. 91, p120a, 1981.

Murata, H., S. Kawano, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma. Am J Gastroenterol, v.94, n.2, Feb, p.451-5. 1999.

Nijsten, T., C. G. Colpaert, et al. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. Br J Dermatol, v.151, n.4, Oct, p.837-45. 2004.

Northup, N.C., et al., Variation among pathologists in their histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation V 17, p. 5 61-64, 2005.

occurring canine cancer. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, v. 70, p. 479–483, 2004.

Okada, H. e T. W. Mak. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. Nat Rev Cancer, v.4, n.8, Aug, p.592-603. 2004.

O'keefe, D. A. Canine mast cell tumors. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.20, n.4, Jul, p.1105-15. 1990.

Oshima, M., J. E. Dinchuk, et al. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). Cell, v.87, n.5, Nov 29, p.803-9. 1996.

Panayiotis, A. K., et al., Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Immunohistochemical Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. Clinical Cancer Research, v.11, p.1434–1440, 2005.

Paradiso, A. et al Failure of primary breast cancer neoangiogenesis to predict pattern of distant metastatisation. Clin Exp Med, v. 1, p127-32, 2001.

Patnaik, A. K., W. J. Ehler, et al. Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. Vet Pathol, v.21, n.5, Sep, p.469-74. 1984.

Pinczowski, P. Mastocitoma Canino: Abordagem histopatológica e imunoistoquímica na busca de biomarcadores prognósticos, 2008. 68 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Prescott, S. M. Is cyclooxygenase-2 the alpha and the omega in cancer? J Clin Invest, v.105, n.11, Jun, p.1511-3. 2000.

Ranieri, G. e Gasparini, G. Surrogate markers of angiogenesis and metastasis. In: Metastasis Research Protocols. Brooks S (ed). Humana Press, Oxford, p99-114, 2001.

Rebuzzi, L., et al. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. Veterinary immunology and immunopathology, v 115, p 320-33, 2007.

Rech, R R, et al., Mastocitoma cutâneo canino. Estudo de 45 casos, Arqu. Bras. Med. Zootec. v. 56, nº 4, p.441-8, 2004.

Restucci, B. et al., Evaluation of angiogenesis in canine mammary tumors by quantitative platelet endothelial cell adhesion molecule immunohistochemistry. Veterinary Pathology, v. 37, p 297-301, 2000.

Restucci, B. et al., Evaluation of angiogenesis in canine seminomas by quantitative immunohistochemistry. Veterinary Pathology v 128, p. 252-9, 2003.

Rocca, B., L. M. Spain, et al. Distinct roles of prostaglandin H synthases 1 and 2 in T-cell development. J Clin Invest, v.103, n.10, May 15, p.1469-77. 1999.

Rogers, K. S. Mast cell tumors: dilemmas of diagnosis and treatment. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.26, n.1, Jan, p.87-102. 1996.

Sakai, H., A. Noda, et al. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. J Comp Pathol, v.127, n.4, Nov, p.233-8. 2002.

Schmitt, C. A. e Lowe, S. W., Apoptosis and therapy. J. Pathol., v. 187, p. 127-137, 1999.

Schwerdt, G., R. Freudinger, et al. Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells. *Toxicol Sci*, v.85, n.1, May, p.735-42. 2005.

Simoes, J. P., P. Schoning, et al. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet Pathol*, v.31, n.6, Nov, p.637-47. 1994.

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

Stitt, A.W. et al., Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors is regulated in eyes with intra-ocular tumours. *J Pathol*. v 186 (3), p 306-12, 1998.

Strefezzi, R.F., et al., L. Morphometry of Canine Cutaneous Mast Cell Tumours. *Veterinary Pathology*, v.40, p.268-75, 2003.

Subbaramaiah, K., N. Altorki, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem*, v.274, n.16, Apr 16, p.10911-5. 1999.

Sun, Y., et al., Cyclooxygenase-2 overexpression reduces apoptotic susceptibility by inhibiting the citochrome c-dependent apoptotic pathway in human colon cancer cells. *Cancer Research*, v.62, p.6323-6328, 2002.

Takahashi, T., T. Kadosawa, et al. Inhibitory effects of glucocorticoids on proliferation of canine mast cell tumor. *J Vet Med Sci*, v.59, n.11, Nov, p.995-1001. 1997.

Tardy, S., et al., Canine mast cell tumor: clinical Therapeutic and comparative features. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.6, p.61-77, 1992.

Taylor, P. M. Newer analgesics. Nonsteroid anti-inflammatory drugs, opioids, and combinations. Vet Clin North Am Small Anim Pract, v.29, n.3, May, p.719-35, vii. 1999.

Tesei, A., et al., Study of molecular mechanisms of pro-apoptotic activity of NCX 4040, a novel nitric oxide-releasing aspirin, in colon cancer cells lines. Journal of translational medicine, v.5, p. 1-11, 2007.

Thamm D. H.; Vail, D.M.; Mast cell Tumors , In Withrow S.J.; Vail D.M. Small Animal Clinical Oncology, 4 ed. Saunders, 2007,p. 402-24,.

Torres Neto, R., Mastocitoma cutâneo canino: Aspectos clínico citopatológico, morfométrico e imunocitoquímico, 2008. 79 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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. R.Bras.Ci.Vet., v.7, p.159-61, 2000.

Tsujii, M. e R. N. Dubois. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell, v.83, n.3, Nov 3, p.493-501. 1995.

Tsujii, M., S. Kawano, et al. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.7, Apr 1, p.3336-40. 1997.

Vane, J. R. e R. M. Botting. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med, v.104, n.3A, Mar 30, p.2S-8S; discussion 21S-22S. 1998.

Vane, J. R., Y. S. Bakhle, et al. Cyclooxygenases 1 and 2. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.38, p.97-120. 1998.

Wang, D. e R. N. Dubois. Cyclooxygenase 2-derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.2, Jan 13, p.415-6. 2004.

Williams, C. S., M. Tsujii, et al. Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest*, v.105, n.11, Jun, p.1589-94. 2000.

Yu, H. P., et al., Antiproliferation and Apoptosis induced by selective COX-2 inhibitor in human esophageal squamous carcinoma cells. *The journal of applied Research*, v. 5, p.212-220, 2005.

Zha, S., W. R. Gage, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res*, v.61, n.24, Dec 15, p.8617-23. 2001.

Zimmermann, K. C. e D. R. Green. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, v.108, n.4 Suppl, Oct, p.S99-103. 2001.