

2m11.2894.7

Université de Montréal

Expression de la cyclooxygénase-2 dans les carcinomes  
spinocellulaires chez le chien

Par

Ellen Maria Pestili de Almeida

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue  
de l'obtention du grade Maître ès sciences (M.Sc) en sciences  
vétérinaires  
option pathologie

Juin, 2001

©Ellen Maria Pestili de Almeida, 2001



SF  
607  
N54  
2001  
N. 011

1000 3 1732

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :  
Expression de la cyclooxygénase-2 dans les carcinomes  
spinocellulaires chez le chien

Présenté par :  
Ellen Maria Pestili de Almeida

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr Manon Paradis  
Présidente-rapporteuse

Dr Monique Doré  
Directrice de recherche

Dr Jean Sirois  
Codirecteur de recherche

Dr Pierre Hélie  
Membre du jury

Mémoire accepté le :

## Résumé

Le carcinome spinocellulaire est l'un des cancers les plus communs chez les chiens. Les mécanismes régissant le développement de ce cancer sont toutefois peu connus. L'induction de la cyclooxygénase-2 (COX-2), une enzyme essentielle à la biosynthèse des prostaglandines, est impliquée dans l'oncogénèse de plusieurs types de cancer chez l'humain, incluant le carcinome spinocellulaire. Cependant, l'expression de la COX-2 n'a jamais été étudiée dans les carcinomes spinocellulaires qui se développent spontanément chez les animaux. L'objectif de cette étude était de déterminer si les isoformes de la COX sont exprimées dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien. De la peau normale de chien (n = 4) et des carcinomes spinocellulaires provenant de divers sites anatomiques (peau, gueule, doigt) (n = 40) ont été étudiés par immunohistochimie et par analyses de buvardage de type Western en utilisant des anticorps polyclonaux sélectifs pour la COX-1 ou la COX-2. Les résultats ont montré que la COX-2 était fortement exprimée par les kératinocytes néoplasiques dans tous les cas de carcinomes spinocellulaires, tandis qu'elle ne l'était pas dans la peau normale ( $P < 0.01$ ). Par contre, une faible expression de COX-1 a été trouvée dans la peau normale et dans les carcinomes spinocellulaires (fibroblastes du stroma, vaisseaux sanguins et kératinocytes néoplasiques). Des analyses de buvardage de type



Western ont confirmé l'expression de COX-2 (poids moléculaire de 72,000-74,000) seulement dans les carcinomes spinocellulaires. Cette étude démontre pour la première fois que la COX-2 est induite dans les carcinomes spinocellulaires canins et suggère que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la pathogénie de ce type de cancer fréquemment diagnostiqué chez le chien.

Mots-clés : prostaglandine G/H synthétase-2; cyclooxygénase-2; prostaglandines; kératinocytes; chiens; carcinomes spinocellulaires.

## Abstract

Squamous cell carcinoma is one of the most common neoplasms encountered in dogs. It is a malignant tumor that can arise from the epidermis or from a mucosal surface, and presents a wide variety of clinical forms. Cyclooxygenase-2 (COX-2) is upregulated in human squamous cell carcinomas, and is believed to play a role in its oncogenesis. However, the implication of COX-2 in canine squamous cell carcinomas has thus far remained uncharacterized. The objective of the present study was to determine whether COX isoenzymes were expressed in canine squamous cell carcinomas. Normal skin (n=4) and canine squamous cell carcinomas (n=40) from different anatomical locations (skin, mouth, digits) were studied by immunohistochemistry and by immunoblot analysis using polyclonal antibodies selective for COX-1 or COX-2. Small amounts of COX-1 were found in normal and cancerous tissues (in stromal fibroblasts, blood vessels and neoplastic keratinocytes). COX-2 expression in normal skin was faint or absent, but all squamous cell carcinomas (40/40, 100%) displayed strong immunoreactivity for COX-2 ( $P < 0.01$ ). COX-2 immunostaining was predominantly localized in the cytoplasm of neoplastic keratinocytes, often being concentrated around the nuclear membrane. Immunoblot analysis confirmed the restricted expression of COX-2 (Mr = 72,000-74,000) in squamous cell carcinomas. These results demonstrate for the

first time the expression of COX-2 in canine squamous cell carcinomas, and suggest that COX-2 could be involved in the oncogenesis of this common neoplasm in dogs.

Key-words: prostaglandin G/H synthase-2; cyclooxygenase-2; prostaglandins; keratinocytes; dogs; squamous cell carcinomas.

## Table des matières

	Page
Résumé .....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations .....	xi
Dédicaces .....	xii
Remerciements.....	xiii
Introduction .....	1
Recension de la littérature .....	3
1. Le carcinome spinocellulaire.....	3
1.1 Le carcinome spinocellulaire chez le chien.....	3
1.1.1 Épidémiologie et pathogénie.....	3
1.1.2 Signes cliniques et aspect microscopique .....	8
1.1.3 Le carcinome spinocellulaire du doigt.....	9
1.1.4 Le carcinome spinocellulaire de la cavité orale.....	11
1.1.5 Le carcinome spinocellulaire de la truffe.....	13
1.1.6 Diagnostic et traitement .....	14
1.2 Le carcinome spinocellulaire chez l'humain .....	16
1.2.1 Incidence.....	16
1.2.2 Pathogénie.....	17
2. La cyclooxygénase .....	18
2.1 La cascade de l'acide arachidonique .....	18
2.2 Les formes de cyclooxygénase.....	20

	Page
2.3 Implication de la cyclooxygénase dans les tumeurs .....	23
2.4 Les prostaglandines et le cancer .....	25
3. La cyclooxygénase et les carcinomes spinocellulaires .....	28
3.1 Chez l'humain .....	28
3.2 Dans les modèles expérimentaux <u>in vivo</u> .....	29
3.3 Dans les cellules en culture .....	32
Objectif.....	35
Article: Expression of cyclooxygenase-2 in a canine model of naturally- occurring squamous cell carcinomas .....	36
Discussion .....	76
Conclusion .....	81
Bibliographie .....	83

## Liste des tableaux

Page

### Recension de la littérature

Tableau 1 : Localisation anatomique des carcinomes spinocellulaires cutanés chez le chien.....6

Tableau 2 : Site d'origine des carcinomes spinocellulaires chez le chien.....7

### Article

Tableau 1: Characteristics of specimens from dogs with squamous cell carcinomas.....69

## Liste des figures

	Page
<u>Recension de la littérature</u>	
Figure 1 : Cascade de l'acide arachidonique.....	20
 <u>Article</u>	
Figure 1: Expression of COX-1 and COX-2 by normal canine skin.....	70
Figure 2: Expression of COX-1 and COX-2 by canine squamous cell carcinomas.....	72
Figure 3: Immunoblot analysis of COX-1 and COX-2 isoforms in canine skin tissues.....	74

## Liste des sigles et abréviations

ADN:	acide désoxyribonucléique
AINS:	anti-inflammatoire non-stéroïdien
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
ARN:	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
ATP:	adénosine triphosphate
COX-1:	cyclooxygénase-1
COX-2:	cyclooxygénase-2
EGF :	epidermal growth factor
IFN- $\gamma$ :	interféron- $\gamma$
KDa :	kilodaltons
PGE <sub>2</sub> :	prostaglandine E <sub>2</sub>
PGHS-1 :	prostaglandine G/H synthétase-1
PGHS-2 :	prostaglandine G/H synthétase-2
TPA:	phorbol ester 12-0-tetradecanoylphorbol-13 acetate
TXA <sub>2</sub> :	thromboxane A <sub>2</sub>
UV :	ultraviolet



## Dédicaces

À mon mari, qui me donne toujours son appui dans tout ce que je décide  
de faire dans ma vie,

À mes parents, pour leur amour et leur tendresse envers moi,

Et pour Gabriel qui me montre tout le temps que la vie est  
merveilleuse...

## Remerciements

J'aimerais remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué au succès de cette recherche.

D'abord, je voudrais remercier la Dre Monique Doré pour avoir eu la générosité de m'accepter quand je suis arrivée ici au Canada. A ce moment-là, je ne parlais même pas le français. Elle a toujours su être présente et fut, non seulement une excellente directrice, mais aussi une vraie amie. Ses connaissances font d'elle une directrice de choix.

J'aimerais remercier le Dr. Jean Sirois pour sa patience et ses conseils de valeur essentielle; les Drs. Manon Paradis, Nadia Pagé et Frédéric Sauvé pour le temps qu'ils ont bien voulu m'accorder en clinique, Nadine Bouchard pour les connaissances acquises dans le laboratoire et aussi Stéphane Lajoie pour son amitié.

Finalement, j'aimerais remercier le Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal et la «Morris Animal Fondation» pour leur support financier.

## Introduction

Il y a plus de 20 ans, des chercheurs ont trouvé de hautes concentrations de prostaglandines dans les tissus tumoraux chez les animaux et cette découverte a stimulé plusieurs recherches cliniques et expérimentales sur le rôle des prostaglandines dans le cancer. L'expression de la cyclooxygénase-2, une enzyme clé dans la biosynthèse des prostaglandines, a déjà été démontrée dans plusieurs types de cancer humain ainsi que dans quelques cancers canins, comme les adénocarcinomes de la prostate et les carcinomes de l'épithélium de la vessie.

Le cancer est la cause majeure de mortalité des animaux de compagnie et la peau est le site le plus fréquemment atteint par cette maladie chez le chien. Chez cette espèce, le carcinome spinocellulaire est le cancer de la peau le plus commun après le mastocytome et apparaît plus fréquemment sur la peau endommagée par le soleil, étant parfois précédé par la kératose actinique. Le carcinome spinocellulaire est une tumeur maligne provenant de l'épiderme ou d'une muqueuse qui présente, comme altération microscopique, la différenciation tumorale des kératinocytes. Comme chez l'humain, on croit que le rayonnement ultraviolet est la portion de l'irradiation qui contribue au développement de la kératose actinique et du carcinome spinocellulaire chez le chien.

Le carcinome spinocellulaire représente la tumeur maligne la plus commune au niveau des doigts et la deuxième tumeur maligne la plus courante de la cavité orale chez le chien.

Chez l'humain, les tumeurs cutanées de type non-mélanotique sont les cancers les plus fréquents dans plusieurs pays. Malgré un faible taux de mortalité, l'indice de récurrence estimé à environ 50% après cinq ans et la capacité d'invasion locale entraînent des coûts médicaux élevés.

Contrairement aux modèles expérimentaux de tumeurs de la peau et aux tumeurs naturelles chez l'humain, l'implication de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien n'a jamais été rapportée.

## Recension de la littérature

### 1. Le carcinome spinocellulaire

Le carcinome spinocellulaire (ou épithélioma spinocellulaire) est défini comme une tumeur maligne qui origine de l'épiderme ou d'une muqueuse et qui présente comme changement microscopique la différenciation tumorale des kératinocytes (Goldschmidt et Shofer, 1992).

#### 1.1 Le carcinome spinocellulaire chez le chien

##### 1.1.1 Épidémiologie et pathogénie

Le cancer est la cause majeure de mortalité des animaux de compagnie (MacEwen, 1990) et la peau est le site le plus fréquemment atteint par cette maladie chez le chien (Moore et al., 1991). Le carcinome spinocellulaire est le deuxième cancer cutané le plus commun chez le chien et apparaît plus fréquemment sur la peau endommagée par le soleil, étant parfois précédé par la kératose actinique (Walder, 1995). Il y a en effet des évidences qui montrent que la diminution de la couche d'ozone peut influencer les maladies qui sont causées par la lumière ultraviolette, incluant le carcinome spinocellulaire

(Mayer, 1992). Une étude de l'incidence relative des différentes tumeurs de la peau chez les chiens de la région métropolitaine de Melbourne a montré que 5,2 % des tumeurs étaient des carcinomes spinocellulaires et que cette tumeur était la huitième plus commune dans cette région (Finnie et Bostock, 1979). Lors d'une étude rétrospective de néoplasies canines à l'Université du Kansas, 112 carcinomes spinocellulaires ont été rapportés chez 38 races de chien, représentant 3,2 % des 3481 néoplasies étudiées. L'âge moyen des chiens affectés était de 8,3 ans (Strafuss et al., 1976).

Selon Goldschmidt (1984), les chiens souffrant de carcinome spinocellulaire développent habituellement la tumeur tard dans leur vie. D'après Ettinger et Feldman (2000), le risque d'apparition de la tumeur est maximal vers l'âge de 10 à 11 ans. Par ailleurs, Haziroglu et Saglam (1989) ont rapporté un cas de carcinome spinocellulaire de la région ombilicale chez un chiot femelle âgé de 4 mois.

Il n'y a pas de prédilection de race ni de sexe dans l'incidence des carcinomes spinocellulaires (Rogers et al., 1995; Buckman et al., 1998; Salasche, 2000). Cependant, les chiens de grandes races ayant une forte pigmentation de la peau semblent démontrer une prédisposition au développement de carcinomes spinocellulaires du nid unguéal (Madewell et al., 1982; O'Brien et al., 1992; Paradis et al., 1989; Ettinger et Feldman, 2000).

Le carcinome spinocellulaire chez le chien est une tumeur localement invasive qui démontre une prédilection pour les doigts, la face et l'abdomen (Ettinger et Feldman, 2000). Les lésions qui se développent sur la peau non-pigmentée ou légèrement pigmentée, comme l'abdomen et la région inguinale, sont possiblement induites par les rayons actiniques (Finnie et Bostock, 1979; Ettinger et Feldman, 2000; Nikula et al., 1992; Hargis et Thomassen, 1979).

Moins fréquemment, le carcinome spinocellulaire provient de l'oeil et de ses annexes (Latimer et al., 1987; Strafuss et al., 1976), ainsi que du pelvis rénal (Dagli et al., 1997). Aydin et al. (1997) ont aussi décrit un chien âgé de 12 ans atteint d'un carcinome spinocellulaire du poumon. Le Tableau 1 montre la localisation anatomique des carcinomes spinocellulaires cutanés et le Tableau 2 montre le site d'origine des carcinomes spinocellulaires chez le chien selon Goldschmidt et Shofer (1992).

Comme chez l'humain, on croit que le rayonnement ultraviolet est la portion de l'irradiation qui contribue au développement de la kératose actinique et du carcinome spinocellulaire chez le chien. Le degré de pigmentation de la peau et le comportement des animaux déterminent l'exposition aux rayons dangereux et le risque de développement des lésions (Salasche, 2000; Nikula et al., 1992).

En utilisant le chien de race beagle comme modèle animal de carcinome spinocellulaire, Hargis et Thomassen (1979) ont observé que

la kératose actinique s'est développée chez 25% des 1680 beagles mâles et femelles âgés de 3 à 7 ans maintenus à l'extérieur dans un lieu ensoleillé d'une région de haute altitude dans l'ouest américain. Même si des auvents avaient été installés sur les niches, la majorité des chiens préféraient rester à la lumière du soleil. Un carcinome spinocellulaire envahissant unique ou multiple s'est développé chez huit beagles, soit 2% des chiens ayant développé de la kératose actinique.

**Tableau 1** : Localisation anatomique des carcinomes spinocellulaires cutanés chez le chien selon Goldschmidt et Shofer (1992)

Site	Pourcentage
Tête	29,4
Membre antérieur	14,2
Membre postérieur	15,6
Cou	5,3
Dos	1,8
Thorax	4,4
Abdomen	12,9
Périnée	10,7
Queue	4,4
Scrotum	0,4
Multiple	0,9



**Tableau 2** : Site d'origine des carcinomes spinocellulaires chez le chien selon Goldschmidt et Shofer (1992).

Site d'origine	Pourcentage
Peau	26
Doigts	32
Cavité orale	34
Glande mammaire	3
Cavité nasale	3
Autres	2

Nikula et al. (1992) ont aussi montré que la majorité des carcinomes spinocellulaires de l'abdomen apparaissent dans les régions qui démontrent des lésions microscopiques de dermatose actinique. Le rayonnement ultraviolet de la lumière du soleil agit comme un carcinogène sur la peau en induisant des réactions photochimiques qui activent les réactions inflammatoires, altèrent le système immunitaire et endommagent directement l'ADN. Cette combinaison d'événements résulte en la réparation non appropriée des photoproduits de l'ADN, en la mutation permanente des gènes régulateurs et en l'expansion clonale de cellules pré-malignes (Ettinger et Feldman, 2000).

Les causes des carcinomes spinocellulaires chez les chiens non-exposés à la lumière du soleil sont indéterminées, mais les papillomavirus ont été proposés comme un des facteurs d'initiation. En effet, il a été rapporté que le carcinome spinocellulaire peut se développer au site de vaccination contre le papillomavirus oral canin (Ettinger et Feldman, 2000).

### 1.1.2 Signes cliniques et aspect microscopique

Les premiers changements prénéoplasiques chez le chien sont l'érythème et l'œdème cutanés et la formation de squames. Les lésions peuvent progresser pour devenir plus épaisses, indurées et ridées, avec des plaques brunes; par la suite, ces lésions se développent en carcinomes spinocellulaires (Goldschmidt, 1984; Goldschmidt et Shofer, 1992).

Les carcinomes spinocellulaires sont parfois multiples et consistent en des plaques érythémateuses ulcérées ou des petits nodules et des masses qui vont s'infiltrer plus profondément dans la peau (Ettinger et Feldman, 2000; Kitchell et al., 1995; Haziroglu et Saglam, 1989; Walder, 1995; Goldschmidt et Shofer, 1992; Madewell et al., 1981). Les cellules montrent des degrés variés d'atypie et de pléomorphisme et il y a formation de perles de kératine (Goldschmidt, 1984). Les ponts intercellulaires sont présents et les noyaux prennent

différentes formes (Muller, 1967). Un infiltrat de cellules inflammatoires mononucléaires peut accompagner ces lésions. Les lésions mal différenciées ont le pire pronostic (Goldschmidt, 1984). Les métastases se localisent d'abord aux nœuds lymphatiques régionaux et ensuite aux poumons. Le comportement biologique des carcinomes spinocellulaires associés à la lumière du soleil est habituellement moins agressif que les carcinomes non-associés à la lumière du soleil (Ettinger et Feldman, 2000). Selon Walder (1995), s'il y a des métastases, elles sont généralement limitées aux nœuds lymphatiques régionaux, mais une dissémination plus généralisée peut survenir.

### 1.1.3 Le carcinome spinocellulaire du doigt

Le carcinome spinocellulaire est la tumeur maligne la plus commune des doigts chez les chiens. Le carcinome spinocellulaire peut originer de l'épithélium du nid unguéal ou d'autres tissus du doigt (Meleo, 1997; Ettinger et Feldman, 2000). Une étude rétrospective de 62 tumeurs digitales malignes chez le chien a démontré que 33,9 % étaient des carcinomes spinocellulaires du nid unguéal (O'Brien et al., 1992).

Le carcinome spinocellulaire des doigts cause de la boiterie, le gonflement, la douleur et l'inflammation des doigts affectés (Ettinger et Feldman, 2000; Goldschmidt et Shofer, 1992; Goldschmidt, 1984). L'ongle peut être éventuellement remplacé par une masse ulcérée.

L'examen radiographique des doigts affectés indique fréquemment la destruction et la lyse des troisièmes phalanges (Goldschmidt, 1984). En effet, une étude de 117 chiens souffrant de carcinomes spinocellulaires des doigts a révélé que 80 % avaient des évidences radiographiques de lyse osseuse et 13 % avaient des évidences radiographiques de métastases au poumon au moment du diagnostic (Marino et al., 1995). Madewell et al. (1982) ont aussi étudié les carcinomes spinocellulaires du nid de l'ongle de cinq chiens et ont noté qu'ils étaient caractérisés par une croissance lente, une invasion de l'os sous-jacent et des métastases régionales. Tous les chiens avaient des évidences radiographiques et histologiques d'invasion et de destruction de l'os phalangien par la tumeur.

Les chiens de grandes races ayant une forte pigmentation de la peau semblent prédisposés à développer un carcinome spinocellulaire du nid de l'ongle (Madewell et al., 1982; O'Brien et al., 1992; Paradis et al., 1989; Ettinger et Feldman, 2000). Paradis et al. (1989) ont décrit des cas de carcinomes spinocellulaires simples ou multiples du nid de l'ongle chez trois schnauzers géants noirs de la même famille et les auteurs ont spéculé sur une prédisposition génétique au développement de ces tumeurs.

Occasionnellement, les chiens peuvent développer des carcinomes spinocellulaires dans plusieurs doigts. Ces tumeurs peuvent être diagnostiquées au même moment ou encore le chien peut

développer des tumeurs multiples après quelques années (Meleo, 1997). Il n'y a pas d'évidence de prédilection pour certaines pattes ou certains doigts, pour le développement du carcinome spinocellulaire du nid unguéal (Madewell et al., 1982; O'Brien et al., 1992).

Le pronostic semble être influencé par la localisation de la tumeur. Marino et al. (1995) ont en effet noté que les carcinomes spinocellulaires de l'épithélium du nid de l'ongle étaient associés à un taux de survie plus élevé (95%) que les carcinomes spinocellulaires provenant d'autres portions du doigt (60%).

#### 1.1.4 Le carcinome spinocellulaire de la cavité orale

La cavité orale est le quatrième site de cancer chez le chien, représentant environ 6% de toutes les tumeurs malignes (Dhaliwal et al., 1998a). Le carcinome spinocellulaire est la deuxième tumeur orale la plus courante chez le chien (Burk, 1996) (Dhaliwal et al., 1998a). Selon Gardner (1996), les animaux affectés sont généralement âgés de plus de six ans et les tumeurs ont une prédilection pour les mâles et les chiens de petites races. Elles sont localement invasives et métastasent rapidement aux nœuds lymphatiques. Le carcinome spinocellulaire oral chez le chien peut prendre son origine des lèvres, des gencives, de la langue, des amygdales ou de la muqueuse orale (Dhaliwal et al., 1998a).

La gencive est un site fréquent pour le carcinome spinocellulaire chez le chien. Cette tumeur a une prédilection pour les chiens de grandes races et l'âge moyen est d'environ 9 ans (Gardner, 1996). La tumeur peut faire protrusion en surface de la muqueuse de la gencive, mais elle se présente plus communément comme une lésion ulcérée ou érodée qui atteint fréquemment la portion mésiale de la gencive et les dents. Le carcinome spinocellulaire peut détruire la muqueuse et peut envahir le muscle et l'os. L'atteinte de l'os est commune chez le chien, avec un taux d'incidence de 77%. Les métastases aux nœuds lymphatiques régionaux sont communes, alors que les métastases au poumon sont rares et surviennent plus tard dans le processus de la maladie (Ettinger et Feldman, 2000).

Le carcinome spinocellulaire de la langue est plus agressif que celui de la gencive et semble métastaser plus souvent. Cependant, cette localisation est rare (Dhaliwal et al., 1998a). Carpenter et al. (2000) ont rapporté dix cas de carcinome spinocellulaire de la langue chez le chien et ont constaté qu'il n'y avait pas de prédilection de race ou de sexe et que l'âge moyen était de 9,5 ans. Les chiens ayant une tumeur d'aspect histologique plus malin (grade III) avaient un pronostic plus sombre et le taux de métastases était de 37,5%.

Le pronostic pour le carcinome spinocellulaire oral varie beaucoup selon le site affecté dans la gueule. Les carcinomes spinocellulaires de la gencive ou de la portion rostrale de la langue ont un pronostic plus

favorable que ceux des amygdales (Dhaliwal et al., 1998a). Les tumeurs dans la portion rostrale sont curables par la chirurgie ou la radiothérapie, tandis que ceux de l'amygdale ou de la base de la langue sont hautement métastatiques (MacEwen, 1990; Burk, 1996).

#### 1.1.5 Le carcinome spinocellulaire de la truffe

Alors que le carcinome spinocellulaire de la truffe est commun chez les chats (Walder, 1995; White, 1994), cette localisation est rare chez le chien (Walder, 1995). Par contre, le type de tumeur le plus couramment rencontré dans la truffe du chien est le carcinome spinocellulaire et chez cette espèce, le carcinome spinocellulaire n'est pas considéré comme une tumeur induite par la lumière du soleil (Ettinger et Feldman, 2000).

Les carcinomes spinocellulaires de la truffe paraissent avoir un pronostic pauvre lorsque détectés dans les stades avancés (Rogers et al., 1995; MacEwen, 1990). Bien que les métastases régionales ou éloignées soient répandues, l'invasion des tissus sous-jacents, du fascia, du cartilage et de l'os peut empêcher la réussite de la thérapie (Rogers et al., 1995). Les signes cliniques incluent l'épistaxis, l'écoulement nasal et l'ulcération ou l'œdème de la truffe (Ettinger et Feldman, 2000).

### 1.1.6 Diagnostic et traitement

La procédure diagnostique classique est la biopsie de la tumeur. Les nœuds lymphatiques doivent être aspirés pour l'évaluation d'éventuelles métastases (Ettinger et Feldman, 2000).

Les formes traditionnelles de thérapie pour les carcinomes spinocellulaires comprennent l'ablation chirurgicale (Rogers et al., 1995; Finnie et Bostock, 1979; O'Brien et al., 1992; Marino et al., 1995; Strafuss et al., 1976; Goldschmidt et Shofer, 1992), la cryochirurgie (Krahwinkel, 1980; Owen, 1976; Hazirolu et Saglam, 1989; Meleo, 1997) et la radiothérapie (Dhaliwal et al., 1998a; Dhaliwal et al., 1998b; Thrall et Biery, 1977; Burk, 1996).

Selon Meleo (1997), la majorité des chiens ayant un carcinome spinocellulaire ont un bon pronostic après l'excision chirurgicale de la tumeur. L'évaluation histologique est importante pour déterminer le pronostic. Si la tumeur est bien différenciée et l'excision chirurgicale est complète, le taux de récurrence et de métastases est bas. Toutefois, si la tumeur est histologiquement mal différenciée, la possibilité de métastases est plus grande, et dans ces cas, la chimiothérapie doit être considérée.

Thrall et Biery (1977) ont constaté qu'après la radiothérapie, le taux de survie à un an sans évidence clinique de récurrence de la tumeur est d'environ 50 % pour le carcinome spinocellulaire.



D'autres options de traitement ont été rapportées, comme:

- L'hyperthermie induite par ultrasons (Marmor et al., 1978).
- La chimiothérapie utilisant des implants intra-lésionnels avec du collagène, de l'épinéphrine et du 5-fluorouracil ou de la cisplatine (Kitchell et al., 1995).
- La chimiothérapie adjuvante avec doxorubicin, cisplatine, vinblastine, cyclophosphamide et la chimiothérapie combinée avec la radiothérapie (Brooks et al., 1988).
- L'infusion intra-veineuse de cisplatine dans le traitement des carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou (Shapiro et al., 1988).

Comme traitement, l'amputation des doigts affectés est recommandée pour tous les chiens ayant une tumeur digitée sans évidence de métastases. L'excision complète peut nécessiter une désarticulation au niveau métacarpophalangien ou métatarsophalangien, ou plus haut, et après l'excision, la survie moyenne est de 2 ans (Ettinger et Feldman, 2000).

Un ajout important au traitement est d'éliminer les expositions ultérieures à la lumière ultraviolette en maintenant l'animal hors de la lumière directe du soleil (Ettinger et Feldman, 2000).

## 1.2 Le carcinome spinocellulaire chez l'humain

### 1.2.1 Incidence

Le carcinome spinocellulaire représente l'une des tumeurs malignes les plus fréquentes chez l'humain dans plusieurs pays (Marks, 1995; Beani, 1996). Bien que la mortalité soit basse, le taux de récidence est d'environ 50% après cinq ans. Le traitement de ces tumeurs entraîne des coûts médicaux élevés (Katz, 1997; Corona, 1996). Le carcinome spinocellulaire de la tête et du cou est une cause importante de mortalité, affectant plus de 40,000 individus chaque année aux États-Unis. Le carcinome spinocellulaire cutané est responsable quant à lui d'approximativement 2,000 morts annuellement (Greenlee et al., 2000; Buckman et al., 1998). Environ 90% des nouveaux cas de carcinome spinocellulaire et de carcinome des cellules basales aux États-Unis chaque année sont attribuables à l'exposition prolongée à la lumière du soleil (Buckman et al., 1998). L'incidence de carcinomes spinocellulaires chez l'humain augmente chaque année aux États-Unis, un effet possible de la plus grande exposition à la lumière du soleil ainsi que de l'amincissement de la couche d'ozone (Karagas et al., 1999; Katz, 1997; Corona, 1996; Katz, 1997).

### 1.2.2 Pathogénie

Le carcinome spinocellulaire se développe sur la peau humaine non adéquatement protégée de la lumière du soleil (Christophers, 1998; Katz, 1997; Bajdik et al., 1998). Environ 80% des tumeurs originent de la tête, du cou et des bras qui sont toutes des régions d'exposition maximale au soleil (Green et al., 1999; Katz, 1997; Hargis et Thomassen, 1979). La tumeur peut aussi prendre origine des lésions de kératose actinique (Nikula et al., 1992; Muller-Decker et al., 1999). Il y a moins de cas de carcinome spinocellulaire chez les jeunes de moins de 30 ans, ce qui indique que l'exposition prolongée et cumulative à la radiation ultraviolette est un facteur important (Salasche, 2000).

La kératose actinique est une dysplasie épidermique qui apparaît sous forme de lésions délimitées, hyperkératotiques et elle présente des degrés variables d'inflammation. Les kératoses actiniques sont des lésions précancéreuses rougeâtres, petites, écailleuses et généralement hyperkératotiques (Katz, 1997). Il semble que ces lésions soient précurseurs de carcinomes spinocellulaires à cause des similarités épidémiologiques et histologiques (Green et al., 1999).

L'irradiation ultraviolette et la distribution spectrale dans les régions du monde sont influencées par la saison, la latitude, l'altitude, l'épaisseur de la couche d'ozone, la couverture des nuages et la pollution locale de l'air (Nikula et al., 1992). Les régions spectrales de

radiation ultraviolette (UV) de la lumière solaire situées entre 280 et 320 nm (UVB) et 320–400 nm (UVA) sont spécifiquement impliquées dans le dommage actinique de la peau et la carcinogénèse (Green et al., 1999). Des études épidémiologiques confirment que les populations blanches qui vivent relativement proche de l'équateur et qui sont exposées à la lumière intense du soleil souffrent plus couramment de cancers de la peau que d'autres groupes (Green et al., 1999). D'autres facteurs sont aussi impliqués dans le développement des carcinomes spinocellulaires incluant certains désordres génétiques comme le xeroderma pigmentosum (où les cellules de la peau n'arrivent pas à réparer les dommages à l'ADN induits par le soleil), l'immunosuppression et l'exposition aux radiations ou à l'arsenic. Les cicatrices de vaccination, les brûlures et les ulcères chroniques sont aussi des sites à risque élevé de carcinomes (Katz, 1997).

## 2. La cyclooxygénase

### 2.1 La cascade de l'acide arachidonique

L'acide arachidonique est un acide gras non-saturé de 20 carbones (éicosanoïde) distribué à travers la couche bilipidique de la membrane cytoplasmique de la cellule et il est habituellement estérifié à la position SN-2 des phospholipides. Les enzymes phospholipases sciendent l'acide arachidonique lié à la membrane pour le rendre

disponible à la conversion en lipides bioactifs. Une fois libéré, l'acide arachidonique peut être métabolisé vers l'une des trois voies suivantes : la voie de la cyclooxygénase, la voie de la lipoxigénase et la voie de la monooxygénase du cytochrome P-450. La voie la plus étudiée est celle de la cyclooxygénase (Williams et al., 1999).

Les métabolites de l'acide arachidonique sont importants pour de nombreux processus biologiques, incluant l'inflammation, l'ovulation, l'implantation embryonnaire, l'angiogénèse, l'agrégation plaquettaire et la fonction immunitaire (Williams et al., 1999).

Les éicosanoïdes ne sont produits que sur demande et sont des molécules extrêmement versatiles qui agissent comme messagers inter- et intracellulaires (Marks et al., 1999). Ils agissent principalement comme médiateurs locaux de courte durée, impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation, la mort cellulaire programmée (apoptose), les changements vasculaires lors d'inflammation, la migration des leucocytes, en plus d'autres fonctions (Mestre et al., 1997; Marks et al., 1998).

Les prostaglandines (PGs) sont des lipides produits par des mécanismes enzymatiques et nonenzymatiques à partir de l'acide arachidonique. Les prostaglandines, les thromboxanes, la prostacycline et les leucotriènes sont produits par plusieurs tissus par l'oxydation de l'acide arachidonique. La quantité et le type de métabolites produits

varient selon la nature des cellules (Fischer, 1997). Les étapes de la formation des prostaglandines sont schématisées dans la Figure 1.

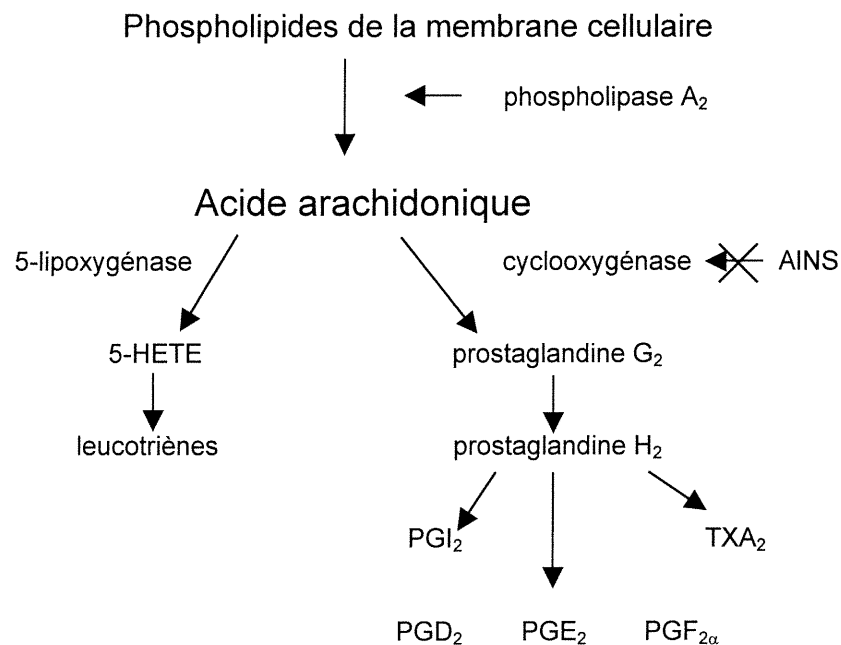


Figure 1 : Cascade de l'acide arachidonique

## 2.2 Les formes de cyclooxygénase

L'enzyme cyclooxygénase (COX) consiste en deux différentes isoenzymes: la COX-1 et la COX-2. La COX-1, qui est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus, est impliquée lors de réponses physiologiques requérant une biosynthèse rapide ou constante de prostaglandines. Cette enzyme participe, entre autres, à la régulation de l'intégrité de l'épithélium gastrique, à l'agrégation des plaquettes et à la régulation du flux sanguin rénal. La deuxième isoforme, la COX-2, est

normalement absente des cellules, mais sa formation peut être induite en réponse entre autres, aux facteurs de croissance, aux promoteurs de tumeurs et aux cytokines (Prescott et Fitzpatrick, 2000; Higashi et al., 2000; Maldve et Fischer, 1996; Williams et al., 1999; Pei et al., 1998; Fischer, 1997; Muller-Decker et al., 1995). La COX-2 est aussi importante lors de réactions inflammatoires (Taketo, 1998; Pei et al., 1998). Alors qu'une variété de facteurs comme le sérum, les facteurs de croissance et les esters de phorbol peuvent augmenter les niveaux d'ARNm pour la COX-1 et la COX-2, la COX-2 répond généralement d'une façon plus rapide et marquée et, conséquemment, peut être considérée comme un produit de gène précoce (Fischer, 1997).

Les deux isoformes de COX (COX-1 et COX-2) partagent des similarités importantes dans leur séquence protéique, avec environ 60% d'identité dans leurs séquences d'acides aminés (Subbaramaiah et al., 1997). Cependant, les deux enzymes sont dérivées de gènes distincts localisés sur deux chromosomes différents et encodées par des ARNm de taille différente, d'environ 2.8 versus 4.0 kb respectivement pour la COX-1 et la COX-2 (Kujubu et al., 1991). Les deux enzymes ont une masse approximative de 71 KDa, ainsi que des sites actifs similaires pour leurs substrats naturels et pour le blocage par les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINSs) (Vane et Botting, 1998). Les différentes réponses de la COX-1 et la COX-2 reflètent, en partie, les différences dans les éléments régulateurs du promoteur des deux gènes

(Mestre et al., 1997).

Il est suggéré que l'action anti-inflammatoire des AINSs est due à l'inhibition de la COX-2 et que les effets collatéraux indésirables comme l'irritation de l'estomac et les effets néphrotoxiques soient dus à l'inhibition de la COX-1 (Vane et Botting, 1998). Des AINSs qui inhibent sélectivement la COX-2 ont récemment été approuvés par le « Food and Drug Administration » (FDA) pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde et sont présentement évalués pour leur potentiel comme médicaments antinéoplasiques (Fosslien, 2000).

Des souris ayant subi l'inactivation du gène de la COX-1 ou de la COX-2 ont été développées et certaines différences sont apparues. En effet, les souris déficientes en COX-2 ont présenté des lésions de dysplasie rénale, une néphropathie sévère, de la fibrose cardiaque et de l'infertilité. Toutefois, les souris déficientes en COX-1 n'ont pas manifesté de phénotypes anormaux et n'ont pas développé de pathologies gastriques, ce qui suggère que l'absence de COX-1 n'est pas suffisante pour causer des ulcérations stomacales (Taketo, 1998).



### 2.3 Implication de la COX dans les tumeurs

Il y a plus de vingt ans, des chercheurs ont trouvé de hautes concentrations de prostaglandines dans les tissus tumoraux chez les animaux (Taketo, 1998). Cette donnée a stimulé plusieurs recherches cliniques et expérimentales sur le rôle des prostaglandines dans le cancer. De nombreuses expériences chez les animaux et des études épidémiologiques chez les humains suggèrent que l'aspirine et d'autres AINSs peuvent protéger contre le cancer du côlon chez l'humain et dans des modèles animaux expérimentaux (Thun et al., 1991; Marnett, 1992; Marks et al., 1999; Gupta et DuBois, 1998; Ahnen, 1998). Ces médicaments peuvent aussi réduire le nombre et la taille des polypes chez des patients atteints de polypose familiale (Taketo, 1998).

L'expression de la COX-2 a déjà été démontrée dans plusieurs types de cancers humains comme les cancers colorectal, pulmonaire, gastrique, pancréatique, prostatique et mammaire ainsi que dans les carcinomes hépatocellulaires, les carcinomes de l'épithélium de la vessie et les adénocarcinomes et carcinomes spinocellulaires de l'œsophage (Kargman et al., 1995; Fosslie, 2000; Ratnasinghe et al., 1999; Wilson et al., 1998; Ristimaki et al., 1997; Tucker et al., 1999; Gupta et al., 2000; Komhoff et al., 2000; Kargman et al., 1995; Lord et al., 1999; Mestre et al., 1999).

Il a aussi été démontré que des souris génétiquement déficientes en COX-2 ont une réduction marquée du nombre et de la taille des polypes intestinaux dans un modèle murin de polypose adénomateuse familiale. Ces souris ont également développé 75% moins de papillomes cutanés induits chimiquement que les souris contrôles, suggérant aussi un rôle de la COX-2 dans la tumorigénèse (Oshima et al., 1996).

Tremblay et al. (1999) ont démontré pour la première fois l'expression de la COX-2 dans une tumeur des animaux domestiques, soit l'adénocarcinome prostatique chez le chien et ont suggéré que son expression pourrait être impliquée dans le cancer de la prostate chez cette espèce. Un rôle potentiel pour la COX-2 dans le cancer de la prostate chez l'humain a aussi été proposé par des études récentes *in vitro* utilisant des lignées cellulaires de cancer prostatique. Les prostaglandines E<sub>2</sub> exogènes ont augmenté la transcription de la COX-2 dans ces cellules (Tjandrawinata et al., 1997), alors qu'un inhibiteur sélectif de la COX-2, le NS398, a induit l'apoptose (Liu et al., 1998).

Komhoff et al. (2000) ont montré par immunohistochimie et par hybridation *in situ* radioactive une expression élevée de la COX-2 dans un haut pourcentage de carcinomes de grade élevé de la vessie, suggérant ainsi un rôle possible de la COX-2 dans la progression du carcinome urothélial de la vessie.

La fonction exacte de la COX-2 dans le développement et la progression des tumeurs *in vivo* n'est pas connue. Une possibilité est

que l'augmentation de l'expression de la COX-2 mène à de hauts niveaux de prostaglandines dans les tissus tumoraux. Cette hypothèse est supportée par les données démontrant des niveaux élevés de prostaglandines, plus fréquemment la PGE<sub>2</sub>, dans les tissus cancéreux comparativement aux tissus normaux (Prescott et Fitzpatrick, 2000; Marnett, 1992; Zimmermann et al., 1999).

#### 2.4 Les prostaglandines et le cancer

Les évidences reliant les prostaglandines au développement des cancers proviennent d'études sur des modèles animaux, ainsi que d'études épidémiologiques chez l'humain montrant que les inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines réduisent la tumorigénèse (Fischer, 1997).

Entre autres, il a été démontré que les prostaglandines peuvent agir comme co-mitogènes et comme inhibiteur de l'apoptose et peuvent aussi stimuler directement la promotion de la tumeur (Marks et al., 1999). Une association entre le gène bcl-2, impliqué dans l'inhibition de l'apoptose, et la COX-2 a été suggérée par les résultats d'une étude démontrant que l'addition de PGE<sub>2</sub> à une lignée cellulaire indépendante a augmenté par un facteur d'environ huit les niveaux de la protéine de bcl-2 (Gupta et DuBois, 1998). En inhibant l'apoptose, les prostaglandines peuvent prolonger la survie des cellules qui contiennent de l'ADN

endommagé (Marks et al., 1999; Michaluart et al., 1999; Fischer et al., 1999; Mestre et al., 1997). Ahnen (1998) a démontré que le sulindac, un puissant AINS qui inhibe la synthèse de prostaglandines via l'inhibition de la COX-1 et la COX-2, freine la croissance d'une variété de lignées de cellules tumorales et induit l'apoptose ainsi que l'arrêt du cycle cellulaire. Le mécanisme d'inhibition de croissance induit par les dérivés du sulindac est dû à l'induction de l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire ne semble pas requis pour l'inhibition de croissance ni l'apoptose.

Aussi, les prostaglandines peuvent faciliter la progression de la tumeur en agissant comme facteurs de différenciation et de croissance, comme immunosuppresseurs et comme agents angiogéniques (Zimmermann et al., 1999; Thun et al., 1991).

Wunsch (1998) a démontré que la COX-2 peut induire la production de facteurs angiogéniques importants pour la croissance du cancer du côlon humain. Les cellules tumorales surexprimant la COX-2 ont présenté une augmentation de la production de facteurs angiogéniques et la migration des cellules endothéliales vers la formation de structures tubulaires. L'aspirine et un inhibiteur sélectif de la COX-2 (NS-398) ont inhibé cette activité. L'angiogénèse est essentielle pour la croissance et le développement de métastases et les AINS peuvent inhiber l'angiogénèse. Par exemple, l'indométhacine à des concentrations de 0,25 mM et 0,5 mM inhibe l'angiogénèse *in vitro* de cellules de l'aorte de souris, de cellules endothéliales microvasculaires

dermiques humaines (HMVECs) et de cellules endothéliales des veines ombilicales (HUVECs). De plus, l'inhibiteur sélectif de la COX-2 NS-398 à des concentrations de 25 mM à 100 mM, inhibe aussi l'angiogénèse *in vitro* dans les mêmes types de cellules. Il semblerait que les AINSs bloquent l'activité «mitogen-activated protein» (MAP) ERK2 kinase et la translocation de ERK2 vers le noyau. La MAP ERK2 kinase est essentielle pour l'angiogénèse des HMVECs, HUVECs et cellules de l'aorte de souris, et l'inhibition de cette kinase par les AINSs semble être une étape critique (Jones et al., 1999; Shiff et Rigas, 1999).

En plus des effets sur la prolifération, la production de prostaglandines semble aussi associée à un potentiel invasif et métastatique augmenté des cellules tumorales. Récemment, plusieurs études ont rapporté que l'augmentation de l'expression de la COX-2 est associée à des altérations du comportement cellulaire. Par exemple, lorsque des cellules de l'épithélium intestinal de souris ont été transfectées avec un vecteur de l'expression de la COX-2, elles ont démontré une augmentation de l'expression de protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire, réversible par l'addition de sulfite de sulindac, un AINS (Tsuji et DuBois, 1995).

### 3. La COX et les carcinomes spinocellulaires

#### 3.1 Chez l'humain

L'expression de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires humains a été étudiée par plusieurs chercheurs. Les niveaux d'ARNm de la COX-2 et de sa protéine sont élevés dans la kératose actinique et le carcinome spinocellulaire, ce qui suggère que l'augmentation de l'expression de la COX-2 est un événement pré-tumoral (Buckman et al., 1998; Muller-Decker et al., 1999; Marks et al., 1999).

L'expression de la COX-2 dans les cas de carcinome spinocellulaire de l'œsophage chez l'humain a aussi été étudiée par plusieurs chercheurs. Zimmermann et al. (1999) ont rapporté que 91 % des carcinomes spinocellulaires de l'œsophage contenaient de la COX-2. Le carcinome spinocellulaire de l'œsophage présente une réactivité intense pour les anticorps contre la COX-2 dans les régions bien différenciées alors que l'épithélium histologiquement normal est faiblement positif (Ratnasinghe et al., 1999). Shamma et al. (2000) ont démontré que la COX-2 peut aussi être un marqueur de la dysplasie de l'œsophage connue chez l'humain sous le nom de « high grade dysplasia ». Ce résultat suggère que la COX-2 peut être impliquée dans les stades précoces de l'oncogénèse du carcinome spinocellulaire de l'œsophage.

Chan et al. (1999) ont montré que les niveaux moyens d'ARNm de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou sont approximativement 150 fois plus élevés que ceux de la muqueuse orale normale. Par ailleurs, Mestre et al. (1999) ont démontré une augmentation de 100 fois de la quantité d'ARNm de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou. Dans cette étude, la protéine de COX-2 a été détectée dans 100% des cas de carcinome spinocellulaire, mais n'a pas été décelée dans la muqueuse normale.

### 3.2 Dans les modèles expérimentaux *in vivo*

Plusieurs études ont utilisé des modèles expérimentaux pour étudier l'expression et le rôle de la COX dans les carcinomes spinocellulaires. Isoherranen et al. (1999) ont démontré que l'irradiation par le soleil induit chez les patients humains l'ARNm de la COX-2 et l'expression de la protéine, tandis que l'expression de l'ARNm de la COX-1 demeure à des niveaux de base.

Pentland et al. (1999) ont quant à eux révélé que 95 % des tumeurs induites par la lumière ultraviolette chez les souris sans poil étaient des carcinomes spinocellulaires et que l'expression de la COX-2 dans ces tumeurs était augmentée. Dans cette étude, l'administration orale de celecoxib, un inhibiteur sélectif de la COX-2, a empêché la formation de la tumeur après la photoexposition. L'expression élevée de

la COX-2 a aussi été démontrée dans les papillomes et dans les régions dysplasiques de l'épiderme, ce qui suggère que l'induction de la COX-2, combinée possiblement avec la synthèse de PGE<sub>2</sub> par les cellules inflammatoires qui peuvent être présentes, sont un stimulus prolifératif capable de surpasser l'engagement cellulaire normal vers la différenciation.

Des études utilisant certains inhibiteurs de la COX ont aussi été réalisées pour démontrer le rôle de la COX dans la carcinogénèse. Dans une des ces études, Fischer et al. (1999) ont rapporté que l'utilisation des AINSs comme le celecoxib et l'indométhacine ont réduit le développement des tumeurs de la peau induites par la lumière ultraviolette chez les souris SKH:HR-1-hrBr sans poil.

Snyderman et al. (1995) ont montré que des souris ayant développé expérimentalement des carcinomes spinocellulaires et ayant été traitées avec du piroxicam pendant 30 jours ont présenté une réduction du poids de leur tumeur. Les niveaux de PGE<sub>2</sub> dans les tissus tumoraux n'étaient toutefois pas en corrélation avec le traitement ou avec la grosseur de la tumeur. Les auteurs ont spéculé que les effets des inhibiteurs de la COX ne résultaient peut-être pas d'un effet direct sur les cellules tumorales, mais proviendraient plutôt des conséquences sur l'infiltration de cellules immunitaires dans la tumeur.

Scioscia et al. (1997) ont aussi traité des souris C3H/HeJ souffrant de carcinomes spinocellulaires avec des inhibiteurs de la COX



(piroxicam et nabumetone) et ont noté une inhibition significative de la croissance de la tumeur et une diminution de son poids final. Cette inhibition de la croissance de la tumeur était associée à l'augmentation des niveaux de la PGE<sub>2</sub> dans le tissu tumoral et à l'infiltration lymphocytaire, suggérant que l'inhibition de la croissance de la tumeur pourrait être reliée à une augmentation de la réponse inflammatoire au site de la tumeur.

Des études sur les papillomes et les carcinomes cutanés induits par le phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13 acetate (TPA) chez la souris ont démontré une expression élevée de COX-2 ainsi qu'une grande quantité de PGE<sub>2</sub> et de PGF<sub>2α</sub> (Muller-Decker et al., 1995). Des lignées cellulaires de kératinocytes correspondant aux différents stades de développement des tumeurs exprimaient aussi beaucoup de COX-2.

Il a aussi été démontré que la COX-2 a catalysé la synthèse *in vivo* de prostaglandines stimulée par le TPA dans l'épiderme des souris et que le résultat était dépendant de la concentration de TPA. La synthèse était supprimée par l'administration topique d'un inhibiteur spécifique de la COX-2 (Muller-Decker et al., 1998). Finalement, le traitement de la peau de souris avec le TPA pendant 6 heures a causé une augmentation du nombre de cellules contenant de la COX-2, principalement dans la couche basale de l'épiderme interfolliculaire (Muller-Decker et al., 1998).

### 3.3 Dans les cellules en culture

Plusieurs études utilisant des lignées cellulaires de carcinome spinocellulaire de différentes origines ont été faites pour montrer l'expression de la COX-2 et ses effets dans ces tumeurs. De plus, le traitement de ces cellules avec des AINSs a été utilisé dans quelques études pour démontrer les effets de la suppression de l'activité de la COX. Par exemple, Zimmermann et al. (1999) ont montré que l'expression de l'ARNm de la COX-2 était associée à la production de la protéine de la COX-2 et aux hauts niveaux de prostaglandines ( $PGE_2$  et 6-keto- $PGF_{1\alpha}$ ) dans les lignées cellulaires de carcinome spinocellulaire de l'œsophage. La  $PGE_2$  a induit l'expression de la protéine bcl-2 et a inhibé l'apoptose. Les cellules ayant été traitées par le flusolide et le NS-398 (deux inhibiteurs sélectifs de la COX-2) ont démontré une suppression de la synthèse de la  $PGE_2$  et une diminution de leur activité proliférative. Le traitement avec le flusolide a aussi induit l'apoptose.

En étudiant l'expression de la COX-2 et la production de  $PGE_2$  dans deux lignées de cellules épidermiques cancéreuses, le carcinome spinocellulaire HSC-5 et le carcinome eccrine EcCa, Higashi et al. (2000) ont trouvé que les deux étaient augmentés dans ces cellules tumorales en comparaison avec une lignée cellulaire de kératinocytes humains non-tumoraux. De plus, ils ont montré que la transfection avec

un oligonucleotide antisense de la COX-2 a supprimé l'expression de sa protéine et a inhibé la croissance cellulaire de façon plus significative que le NS398, un inhibiteur sélectif de la COX-2. Ces auteurs ont spéculé sur l'existence de deux différentes voies de signalisation via COX-2 dans la régulation de la croissance cellulaire.

Des facteurs de croissance comme l'EGF ont été utilisés dans des lignées cellulaires de carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou, entraînant l'augmentation des niveaux de l'ARNm et de la protéine de la COX-2 et de la synthèse de prostaglandines (Mestre et al., 1999).

La stimulation de cultures de kératinocytes humains ou murins par des agonistes comme l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), le « transforming growth factor » et le TPA a résulté en l'induction de l'ARNm de la COX-2 ou de sa protéine (Maldve et Fischer, 1996; Matsuura et al., 1999). Par contre, l'INF- $\gamma$  n'a pas induit l'expression de la COX-2 dans les lignées cellulaires provenant de carcinomes spinocellulaires, suggérant des altérations dans la réponse à l'IFN- $\gamma$  par les kératinocytes cancéreux (Matsuura et al., 1999).

Finalement, Mestre et al. (1997) ont démontré que le traitement avec le TPA cause une augmentation de la synthèse de PGE<sub>2</sub> dans les lignées cellulaires de carcinomes spinocellulaires humains et cet effet est supprimé par l'all-trans-RA 13-cis RA retine-acétate, un rétinoïde. Les rétinoïdes suppriment la transcription de la COX-2 induite par les

facteurs de croissance épidermique dans les cellules de carcinomes spinocellulaires oraux humains.

## Objectif

Contrairement aux modèles expérimentaux de tumeurs de la peau et aux tumeurs naturelles chez l'humain, l'implication de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien n'a jamais été rapportée. Les objectifs de cette étude étaient donc de déterminer l'expression de la COX dans les carcinomes spinocellulaires chez cette espèce, d'identifier quelles isoformes étaient impliquées (COX-1 et/ou COX-2) et de déterminer leur localisation cellulaire.

Article :

Almeida EMP, Piché C, Sirois J, Doré M. 2001. Expression of Cyclooxygenase-2 in a Canine Model of Naturally-Occurring Squamous Cell Carcinomas. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49: 867-875.

Expression of Cyclooxygenase-2 in a Canine Model of  
Naturally-Occurring Squamous Cell Carcinomas

Ellen Maria Pestili de Almeida\*, Caroline Piché\*,  
Jean Sirois<sup>#</sup> and Monique Doré\*<sup>¶</sup>

\*Département de pathologie et microbiologie and <sup>#</sup>Centre de recherche  
en reproduction animale, Faculté de médecine vétérinaire,  
Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canada J2S 7C6

<sup>¶</sup>To whom all correspondence and reprint requests should be addressed:  
Dr. M. Doré, Département de pathologie et microbiologie, Faculté de  
médecine vétérinaire, Université de Montréal, C.P. 5000, St-Hyacinthe,  
Québec, Canada J2S 7C6. Phone: 450-773-8521 ext. 8237, Fax: 450-  
778-8116, E-mail: [doremo@medvet.umontreal.ca](mailto:doremo@medvet.umontreal.ca)

## ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is one of the most common cancers in humans, and is also a frequently diagnosed neoplasm in dogs. Induction of cyclooxygenase-2 (COX-2), a key rate-limiting enzyme in prostaglandin biosynthesis, has been implicated in the oncogenesis of various cancers in humans, including squamous cell carcinomas. However, expression of COX-2 has not been reported in spontaneous squamous cell carcinomas of non-human species. Canine squamous cell carcinomas share several similarities with the human disease, and therefore, the objective of this study was to determine whether COX isoenzymes were expressed in naturally-occurring cases of squamous cell carcinomas in dogs. Canine normal skin (n = 4) and squamous cell carcinomas (n = 40) were studied by immunohistochemistry and immunoblot analysis using polyclonal antibodies selective for COX-1 or COX-2. Results showed that COX-2 was strongly expressed by neoplastic keratinocytes in all cases of squamous cell carcinomas, whereas no COX-2 was detected in normal skin ( $P < 0.01$ ). Immunoblot analysis confirmed the restricted expression of COX-2 (72,000-74,000 molecular weight doublet) in squamous cell carcinomas only. In contrast, faint COX-1 staining was found in normal skin and in squamous cell carcinomas. This study demonstrates for the first time that COX-2 is induced in canine squamous cell carcinomas, and



provides a new model to investigate the role and regulation of COX-2 gene expression in naturally-occurring squamous cell carcinomas.

Key words: Prostaglandin G/H synthase-2, cyclooxygenase, prostaglandins, keratinocytes, dogs, squamous cell carcinomas.

## INTRODUCTION

Squamous cell carcinoma is one of the most frequent malignant tumors in humans, and can originate from different sites lined by a squamous epithelium (Greenlee *et al*, 2000). Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a major cause of mortality, affecting over 40,000 individuals each year in the United States, while cutaneous squamous cell carcinoma is responsible for approximately 2,000 deaths annually (Greenlee *et al*, 2000; Buckman *et al*, 1998). Similarly, squamous cell carcinoma is one of the most common neoplasms encountered in dogs, and shares several similarities with the human disease (Moulton, 1990; Dhaliwal *et al*, 1998). As in humans, it is a malignant tumor that can arise from the epidermis or from a mucosal surface (principally the oral cavity). In both species, tumor prevalence increases with advancing age, and there is no breed or race predilection (Buckman *et al*, 1998; Salashe, 2000). Also, tumors may arise from a variety of anatomical sites in both humans and dogs (Buckman *et al*, 1998; Salashe, 2000). Squamous cell carcinoma of the skin in dogs is a locally invasive tumor that demonstrates a predilection for the feet, face and abdomen (Ettinger and Feldman, 2000). Tumors that develop in unpigmented or lightly pigmented skin, such as the abdomen and inguinal areas, are believed to be induced by sunlight (Ettinger and Feldman, 2000; Nikula *et al*, 1992). Intraoral squamous cell carcinomas

in dogs can arise from the lips, gingiva, tongue, tonsils or buccal mucosa (Dhaliwal *et al*, 1998). Canine tonsillar squamous cell carcinomas are rapidly progressing neoplasms that frequently metastasize to regional lymph nodes, and the dog is the only species, other than man, that commonly exhibits tonsillar carcinoma (Dhaliwal *et al*, 1998; Todoroff and Brodey, 1979; Gardner, 1996).

Prostaglandins are believed to play a role in the development and progression of some forms of cancer (Herschman *et al*, 1995; Taketo, 1998; DuBois *et al*, 1998; Subbaramaiah *et al*, 1997; Rustgi, 1998; Ziegler, 1999; Lipsky, 1999). The first rate-limiting step in the synthesis of all prostaglandins from arachidonic acid is controlled by the enzyme prostaglandin G/H synthase, also known as cyclooxygenase (COX) (Smith, 1992; Funk, 1993). COX is a homodimer composed of two subunits of about 70,000 daltons and one heme group (van der Ouderaa *et al*, 1979; Kulmacz and Lands, 1984). Two forms of cyclooxygenase have been identified, namely COX-1 and COX-2. COX-1 is constitutively expressed in many tissues, and is thought to mediate physiologic responses requiring a rapid and/or constant biosynthesis of prostaglandins. COX-2 is normally absent from cells, but can be induced in response to inflammatory reactions, growth factors and tumor promoters (Williams and DuBois, 1996; Herschman, 1996). The two isoforms share important similarities at the protein level, with about 60% identity in their amino acid sequences (Subbaramaiah *et al*, 1997).

However, COX-1 and -2 are derived from distinct genes located on two different chromosomes, and are encoded by messenger RNA (mRNA) of different sizes (about 2.8 versus 4.0 kb for COX-1 and -2, respectively) (Kujubu *et al*, 1991; Funk *et al*, 1991; Kosaka *et al*, 1994). The different responses of COX-1 and COX-2 reflect, in part, differences in the regulatory elements in the promoter of the two genes (Mestre *et al*, 1997).

Expression of COX-2 has been demonstrated in various human neoplasms including colorectal, lung, gastric, pancreatic, prostatic, breast and hepatocellular adenocarcinomas, transitional cell bladder carcinomas, and adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the oesophagus (Fosslie, 2000; Wilson *et al*, 1998, Ratnasinghe *et al*, 1999; Ristimaki *et al*, 1997; Tucker *et al*, 1999; Parrett *et al*, 1997; Gupta *et al*, 2000; Kargman *et al*, 1995; Kömhoff *et al*, 2000). Recent studies have found that COX-2 is upregulated *in vivo* in human precancerous skin lesions such as actinic keratoses and in squamous cell carcinomas (Buckman *et al*, 1998; Müller-Decker *et al*, 1999). Chan *et al*. (1999) also reported that COX-2 mRNA and protein are increased in squamous cell carcinomas of the head and neck in humans. *In vitro*, ultraviolet (UV) B irradiation of human keratinocytes induced upregulation of COX-2 expression, suggesting the involvement of COX-2 in skin tumor development following prolonged sunlight exposure (Buckman *et al*, 1998; Isoherranen *et al*, 1999). Experimental administration of a

selective inhibitor of COX-2 to hairless mice irradiated with UV light reduced tumor yield if the anti-COX-2 was administered during the irradiation period or prevented new tumor formation if the compound was administered after the onset of photocarcinogenesis (Fischer *et al*, 1999; Pentland *et al*, 1999) . However, in contrast to experimental models of chemical- or radiation-induced skin tumors in rodents, the implication of COX-2 in animal models of spontaneous squamous cell carcinomas has never been reported. Therefore, the objectives of the present study were to determine whether COX isoenzymes are expressed in canine squamous cell carcinoma and, if so, to identify which isoform is involved (COX-1 and/or COX-2), and to determine its cellular localization.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Diethyldithiocarbamic acid (DEDTC), octyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (octyl glucoside) and diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) were purchased from Sigma (St-Louis, MO); [ $^{125}$ I]Protein A and Biotrans nylon membranes (0.2  $\mu$ m) from ICN Pharmaceuticals (Montreal, Quebec); [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP from DuPont NEN Research Products (Mississauga, Ontario); nitrocellulose membranes (0.45  $\mu$ m) from Schleicher & Schuell (Kneene, NH); Rainbow molecular weight markers from Amersham (Arlington Heights, IL); Vectastain ABC kit from Vector Laboratories (Burlingame, CA); Kodak film X-OMAT AR from Eastman Kodak Company (Rochester, NY); Phosphate buffered saline (PBS) from Gibco (Grand Island, NY); and Bio-Rad Protein Assay and electrophoretic reagents from Bio-Rad Laboratories (Richmond, CA).

### Tissue Samples and Platelet Isolation

Forty cases of canine squamous cell carcinomas submitted to the Département de pathologie et microbiologie of the Faculté de médecine vétérinaire (Université de Montréal) were included in the study. All cases were confirmed as squamous cell carcinomas by examination of hematoxylin-eosin-saffran-stained (HES) sections by a veterinary pathologist. The malignant nature of the squamous cell carcinomas was defined using criteria such as anaplasia (anisocytosis, pleomorphism,

anisokaryosis), loss of normal polarity, anarchic growth, atypical mitotic figures, and local or vascular invasion. The histological classification used was the World Health Organization International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals (Hall *et al*, 1976). Normal skin was obtained from four adult Beagle dogs euthanatized for reasons unrelated to health problems. All tissues studied were fixed in 10% neutral buffered formalin, whereas samples from normal skin and a squamous cell carcinoma were frozen at -70°C for immunoblot analysis.

#### Anti-COX Antibodies

Two anti-COX antibodies (antibodies 8223 and MF243) were used. Affinity-purified polyclonal antibody 8223 was raised in rabbits against ovine COX-1, and was shown to be selective for COX-1 in various species (Sirois, 1994; Sirois and Doré, 1997). Antibody MF243 was generously provided by Drs. Jilly F. Evans and Stacia Kargman (Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire-Dorval, Québec, Canada). MF243 was raised in rabbits against ovine placental COX-2 and its selectivity for COX-2 has previously been characterized (Kargman *et al*, 1995; Tremblay *et al*, 1999).

#### Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed using the Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, Ca), as previously

described (Doré *et al*, 1993). Briefly, formalin-fixed tissues were paraffin-embedded, and 3 µm-thick sections were prepared and deparaffined through graded alcohol series. Endogenous peroxidase was quenched by incubating the slides in 0.3% hydrogen peroxide in methanol for 30 min. After rinsing in PBS for 15 min, sections were incubated with diluted normal goat serum for 20 min at room temperature. Primary antibodies diluted in PBS were applied (8223 at 1:100 dilution and MF243 at 1:7,500 dilution), and sections were incubated overnight at 4°C. Control sections were incubated with PBS or with non-immune rabbit serum. After rinsing in PBS for 10 min, a biotinylated goat anti-rabbit antibody (1:222 dilution) was applied, and sections were incubated for 45 min at room temperature. Sections were washed in PBS for 10 min, and incubated with the avidin DH-biotinylated horseradish peroxidase H reagents for 45 min at room temperature. After PBS wash for 10 min, the reaction was revealed using diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) as the peroxidase substrate. Sections were counterstained with Gill's hematoxylin stain and mounted. Immunoreactivity was evaluated in a blinded fashion by two independent observers using a grading system where 0 = 0 %, 1 = less than 10%, 2 = 10 to 30%, 3 = 31 to 60%, and 4 = greater than 60 % of positive cells. Also, the intensity of COX-2 immunoreactivity was graded from - = no, + = weak, ++ = moderate, and +++ = strong staining.



### Solubilized cell extracts and immunoblot analysis

Solubilized cell extracts were prepared as previously described (Sirois and Doré, 1997). Briefly, tissues were homogenized on ice in TED buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA], and 1mM diethyldithiocarbamic acid [DEDTC]) containing 2 mM octyl glucoside, and centrifuged at 30,000 x g for 1 h at 4°C. The crude pellets (membranes, nuclei, and mitochondria) were sonicated (8 sec/cycle; 3 cycles) in TED sonication buffer [20 mM Tris (pH 8.0), 50 mM EDTA, and 0.1 mM DEDTC) containing 32 mM octyl glucoside. The sonicates were centrifuged at 16,000 x g for 15 min at 4°C. The recovered supernatant (solubilized cell extract) was stored at -70°C until electrophoretic analyses were performed. The protein concentration was determined by the method of Bradford (Bio-Rad Protein Assay). Proteins were resolved by one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and electrophoretically transferred to nitrocellulose filters, as described (Sirois and Doré, 1997). Filters were incubated with anti-COX antibodies diluted in TBS (10 mM Tris-buffered saline, pH 7.5) containing 2% nonfat dry milk. [<sup>125</sup>I]Protein-A (1 x 10<sup>6</sup> cpm/ml TBS-2% milk) was used to visualize immunopositive proteins. Filters were washed three times (10 min/wash) in TBS-0.05% Tween-20 and exposed to film at -70°C.

### Statistical analysis

The Fisher's exact test was used to compare the frequency of COX-2 expression between normal skin and skin squamous cell carcinomas. Statistical analyses were performed using the JMP Software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTS

Characteristics of dogs with squamous cell carcinomas. The age of dogs with squamous cell carcinomas ranged from 3.5 to 12.8 years old, with a mean of 8.4 years. Eighty-five percent of dogs (34/40 cases) were more than 6 years old at the time of cancer diagnosis, which is more than 40 years old when expressed in equivalent human years (Reeve and DeForest, 1988). Of the 40 cases, 25 animals (62.5%) were large-breed dogs (Table 1). There was no sex predilection as 22 animals (55%) were females and 18 (45%) were males (Table 1). The majority of tumors (24/40, 60%) were located on the feet, whereas 9 cases (22.5%) originated from the skin and seven (17.5%) were located in the oral cavity.

COX expression in normal canine skin. To determine whether COX-1 and/or COX-2 was expressed under physiological conditions, immunohistochemical staining was performed on normal canine skin (n = 4). Results showed that no COX-1 was present in the epidermis or in the follicle walls (Fig. 1, A), while some COX-1 staining was found in smooth muscle cells of arrector pili muscles (Fig.1, C). However, no COX-2 expression was detected in normal canine skin (Fig. 1, B).

Induction of COX-2 in canine squamous cell carcinomas. In contrast to

normal skin where no COX-2 expression was found, all cases of squamous cell carcinomas (100%) displayed immunoreactivity for COX-2. The extent and intensity of the COX-2 staining varied between tumors (Table I). COX-2 immunostaining was predominantly localized in the cytoplasm of neoplastic keratinocytes (Fig. 2, A-D), often being concentrated around the nuclear membrane (Fig. 2, C). In a small number of tumors (n = 3/40), fusiform fibroblast-like cells located in the stroma were COX-2-positive (Fig. 2, E). In the majority of carcinomas (n = 35/40), neoplastic keratinocytes also displayed very weak positive staining for COX-1 (Fig. 2, F).

Immunoblotting of COX isoforms in canine tissues. To confirm the specificity of each antibody and to characterize each COX isoform, solubilized cell extracts were prepared from normal skin, a squamous cell carcinoma and canine platelets, and proteins analyzed by Western blotting. When a selective anti-ovine COX-1 antibody was used, a very faint 69,000 molecular weight ( $M_r$ ) band was detected in the squamous cell carcinoma (Fig. 3, A). A band of identical molecular weight was detected in canine platelets (Fig. 3, A), and thus corresponded to canine COX-1. When a selective anti-ovine COX-2 antibody was used, no signal was detected in normal skin, but a strong COX immunoreactivity was observed in the squamous cell carcinoma (Fig. 3, B). Canine COX-2 appeared as a 72,000-74,000  $M_r$  doublet and a small 62,000  $M_r$  band

(Fig. 3, B) believed to correspond to a proteolytic fragment, as previously observed in other species (Sirois, 1994; Sirois and Doré, 1997; Sirois and Richards, 1992). The absence of detectable COX-2 in canine platelets is in keeping with reports in other species (DuBois *et al*, 1998).

## DISCUSSION

This study is the first to document the expression of COX-2 in naturally-occurring squamous cell carcinomas in animals. Interestingly, whereas no or very low expression of the enzyme was observed in normal skin, all cases of canine squamous cell carcinomas examined expressed COX-2. COX-2 was abundantly present in neoplastic keratinocytes, and in stromal cells within some tumors. Tumors originated from different anatomical locations (i.e. mouth, feet or skin), with no predilection of COX-2 expression to a specific site as all cases contained immunoreactive cells. In humans, squamous cell carcinomas from different anatomical sites including the skin, head and neck, the lung and the esophagus have also been shown to overexpress COX-2 (Ratnasinghe *et al*, 1999; Müller-Decker *et al*, 1999; Chan *et al*, 1999; Wolff *et al*, 1998). The high prevalence of COX-2 positive tumors in dogs is also in agreement with a recent report in humans where all tumors (10/10 cases) were shown to express COX-2 (Chan *et al*, 1999). The perinuclear concentration of the enzyme in some cancer cells is in keeping with the phenotype reported in previous studies (Subbaramaiah *et al*, 1997; Morita *et al*, 1995). The mean age of 8.4 years of affected dogs in this study corresponds to approximately 50 years for humans, suggesting that, as in humans, spontaneous squamous cell carcinoma in dogs is influenced by age.

Among the etiologic factors contributing to skin cancer, ultraviolet (UV) irradiation plays a central role in the development of cutaneous squamous cell carcinomas in humans, in part through its ability to induce prostaglandin synthesis (Buckman *et al*, 1998; Grewe *et al*, 1993). An association between UV, solar dermatosis and squamous cell carcinomas has also been suggested in dogs in a study where animals exposed to the long-term effects of low-level ionizing radiation displayed an increased risk of developing solar dermatosis and squamous cell carcinomas (Nikula *et al*, 1992). Two recent studies have demonstrated that irradiation of cultured human keratinocytes or of human subjects results in the upregulation of COX-2 protein, suggesting a role for COX-2 in prostaglandin synthesis in response to acute UVB irradiation (Buckman *et al*, 1998; Isoherranen *et al*, 1999). Specific inhibitors of COX-2 have also been shown to reduce UV-induced skin tumor development in hairless mice (Fischer *et al*, 1999; Pentland *et al*, 1999). It is possible that UVB irradiation contribute to the increased COX-2 expression through its action on the tumor suppressor gene p53. Indeed, p53 has recently been shown to cause a marked decrease in the expression of COX-2 in mouse fibroblasts (Subbaramaiah *et al*, 1999). Since UVB irradiation of mouse skin induces mutations of the p53 gene, the presence of mutant forms of p53 in malignant tissues could contribute to the high levels of COX-2. Interestingly, mutations of the p53 gene have been reported in natural cases of squamous cell

carcinomas in dogs (Gamblin *et al*, 1997; Mayr *et al*, 1999).

Overexpression of COX-2 has also been reported in various experimental models of skin carcinogenesis (Müller-Decker *et al*, 1995; Müller-Decker *et al*, 1998; Scioscia *et al*, 1997; Nishimura *et al*, 1999; Maldve and Fischer, 1996; Matsuura *et al*, 1999). Papillomas and carcinomas induced in mice by a procedure of initiation-promotion were found to overexpress COX-2, and administration of a specific COX-2 inhibitor suppressed papilloma development and retarded their malignant progression in the same murine model of skin carcinogenesis (Müller-Decker *et al*, 1995; Müller-Decker *et al*, 1998). Cyclooxygenase inhibitors such as piroxicam and nabumetone have also been reported to inhibit tumor growth and decrease tumor weight in mice inoculated subcutaneously with cells from squamous cell carcinomas of the head and neck (Scioscia *et al*, 1997). Additionally, a selective COX-2 inhibitor (JTE-522) was shown to suppress tumor growth in nude mice injected with human head and neck squamous cell carcinoma cells (Nishimura *et al*, 1999). Stimulation of cultures of human or murine keratinocytes by agonists such as interferon- $\gamma$ , transforming growth factor- $\beta$  or 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) resulted in the induction of COX-2 mRNA or protein (Maldve and Fischer, 1996; Matsuura *et al*, 1999). In contrast, interferon- $\gamma$  was ineffective in inducing COX-2 expression in squamous cell carcinoma cell lines, suggesting alterations in the IFN-



response pathway in cancerous keratinocytes (Matsuura *et al*, 1999).

The precise mechanisms by which COX-2 expression contribute to carcinogenesis are beginning to unravel, and include effects on cell proliferation, apoptosis, cell invasion and immune response (Fischer, 1997). In humans and rats, prostaglandins appear to be required for normal cell proliferation of skin keratinocytes (Fischer, 1997). A recent study reported that the enhanced expression of COX-2 in a human skin epidermal cancer cell line compared with a normal keratinocyte cell line played a role in cell growth (Higashi *et al*, 2000). In the latter study, suppression of COX-2 expression with antisense oligonucleotides resulted in a significant inhibition of cell growth. Prostaglandins have also been reported to contribute to the growth of some, but not all, colon cancers (Fischer, 1997). Inhibition of apoptosis also appears to contribute to the carcinogenesis of COX-2 expressing cancers (Fischer, 1997). Indeed, Tsuji *et al.* (1995) have shown that intestinal epithelial cells permanently transfected with a COX-2 expression vector were resistant to apoptosis. Subbaramaiah *et al.* (1999) speculated that the mechanisms underlying this inhibition of apoptosis could include an effect on nucleobindin, an apoptosis-associated protein, or the modulation of intracellular arachidonic acid. Enhanced angiogenesis and increased invasiveness have also been observed in cancer cells overexpressing COX-2 (Fosslien, 2000). Williams *et al.* (2000) recently showed that tumor growth was markedly attenuated when Lewis lung

carcinoma cells were implanted into COX-2 genetically deficient in COX-2. Moreover, a decrease in vascular density was observed in tumors grown in these COX-2 deficient mice, suggesting that host-derived COX-2 could regulate intratumor vascular density (Williams *et al*, 2000). High levels of some prostaglandins (PGE<sub>2</sub>) are also known to suppress immune surveillance and to impair killing of malignant cells (Fischer, 1997). Administration of indomethacin, a non selective COX inhibitor, to patients with squamous cell carcinomas of the head and neck resulted in a significant increase in the number of infiltrating CD2+ lymphocytes in the tumors (Cross *et al*, 1992). These results suggest that production of prostaglandins contribute to an inhibition of cellular immunity in this type of cancer.

Evidence for the role of COX-2 in tumor progression in humans also come from promising results obtained with trials of therapy aimed at the specific inhibition of COX-2 expression in colon, bladder and skin cancer (Ziegler, 1999). Interestingly, a Phase I trial of piroxicam in dogs with naturally occurring tumors resulted in a partial remission of the disease in three of five dogs with a squamous cell carcinoma (Knapp, 1992). Piroxicam has also been shown to be effective in the treatment of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs, a form of cancer where overexpression of COX-2 by tumor cells has been reported in both humans and dogs (Khan *et al*, 2000; Knapp *et al*, 1994; Mohammed *et al*, 1999). These results suggest that strategies directed

at the inhibition of COX-2 represent a potentially effective way of treatment of squamous cell carcinomas.

In summary, squamous cell carcinomas share many similarities between humans and dogs, including an increased prevalence with advancing age, an absence of breed or race predilection, and the presence of tumors arising from a variety of anatomical sites. The present study further strengthens the parallel between the two species by establishing that, as in humans, induction of COX-2 occurs in most, if not all, squamous cell carcinomas in dogs. It should also be considered that, as companion animals, dogs share with humans a similar environment, and are possibly exposed to the same external factors that contribute to cancer. Thus, in view of all these similarities, we propose the dog as a valuable model to study the role and regulation of COX-2 gene expression in naturally-occurring cases of squamous cell carcinomas.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Drs. Jilly F. Evans and Stacia Kargman, Merck Frosst Centre for Therapeutic Research, Pointe-Claire-Dorval, Québec for kindly providing antibody MF243. This work was supported by grants from the Morris Animal Foundation (M.D and J.S.), the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (M.D.) and the Medical Research Council (MRC) of Canada (J.S.). J.S. is the recipient of a MRC of Canada Scientist award.

## REFERENCES

1. Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J, Pentland AP (1998) COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19:723-729
2. Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL, Dannenberg AJ (1999) Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59:991-994
3. Cross DS, Platt JL, Juhn SK, Bach FH, Adams GL (1992) Administration of a prostaglandin synthetase inhibitor associated with an increased immune cell infiltrate in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118:526-528
4. Dhaliwal RS, Kitchell BE, Maretta SM (1998) Oral tumors in dogs and cats. Part I. Diagnosis and clinical signs. *Compendium on Continuing Education* 20:1011-1021
5. Doré M, Hawkins HK, Entman ML, Smith CW (1993) Production of a monoclonal antibody against canine GMP-140 (P-Selectin) and studies of its vascular distribution in dog tissues. *Vet Pathol* 30:213-222

6. DuBois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van de Putte LBA, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12:1063-1073
7. Ettinger SJ, Feldman EC (2000) Cancer. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and cat. 5th ed.* W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania, p. 524-528
8. Fischer SM (1997) Prostaglandins and cancer. *Frontiers in Bioscience* 2:d482-500
9. Fischer SM, Lo H-H, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, Conti CJ (1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25:231-240
10. Fosslien E (2000) Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30:3-21
11. Funk CD (1993) Molecular biology in the eicosanoids field. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 45:67-98
12. Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, FitzGerald GA (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 5:2304-2312
13. Gamblin RM, Sagartz JE, Couto CG (1997) Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res* 58:857-863

14. Gardner DG (1996) Spontaneous squamous cell carcinomas of the oral region in domestic animals: a review and consideration of their relevance to human research. *Oral Diseases* 2:148-154
15. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA (2000) Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50:7-33
16. Grewe M, Trefzer U, Ballhorn A, Gyufko K, Henniger H, Krutmann J (1993) Analyses of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by human epidermoid carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 101:528-531
17. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H (2000) Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 42:73-78
18. Hall WC, Nielsen SW, McEntee K (1976) Tumours of the prostate and penis. In: *Bulletin of The World Health Organization, International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals, Vol. 53, Geneva, Switzerland, p. 247-256*
19. Herschman HR (1996) Review: prostaglandin synthase-2. *Biochem Biophys Acta* 1299:125-140
20. Herschman HR, Xie W, Reddy S (1995) Inflammation, reproduction, cancer and all that... The regulation and role of the inducible prostaglandin synthase. *BioEssays* 17:1031-1037
21. Higashi Y, Kanekura T, Kanzaki T (2000) Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells:

- evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* 86:667-671
22. Isoherranen K, Punnonen K, Jansen C, Uotila P (1999) Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140:1017-1022
  23. Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S (1995) Expression of Prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 55:2556-2559
  24. Khan KN, Knapp DW, Denicola DB, Harris RK (2000) Expression of cyclooxygenase-2 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs. *Am J Vet Res* 61:478-481
  25. Kömhoff M, Guan Y, Shappell HW, Davis L, Jack G, Shyr Y, Koch MO, Shappell SB, Breyer MD (2000) Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am J Pathol* 157:29-35
  26. Kosaka T, Miyata A, Ihara H, Hara S, Sugimoto T, Takeda O, Takahashi E, Tanabe T (1994) Characterization of the human gene (PTGS2) encoding prostaglandin-endoperoxide synthase 2. *Eur J Biochem* 221:889-897
  27. Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R, Chan TC (1992) Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29:214-218
  28. Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR,



- DeNicola DB, Teclaw R, Bonney PL, Kuczek T (1994) Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 8:273-278
29. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872
30. Kulmacz RJ, Lands WEM (1984) Prostaglandin H Synthase: Stoichiometry of heme cofactor. *J Biol Chem* 259:6358-6363
31. Lipsky PE (1999) The clinical potential of cyclooxygenase-2-specific inhibitors. *Am J Med* 106(5B):51S-57S
32. Maldve RE, Fischer SM (1996) Multifactor regulation of Prostaglandin H Synthase-2 in murine keratinocytes. *Mol Carcinog* 17:207-216
33. Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arata J, Jetten AM (1999) Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon and transforming growth factor in normal human epidermal keratinocytes and squamous cell carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 274:29138-29148
34. Mayr B, Reifinger M, Alton K (1999) Novel canine tumour suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary

- neoplasms. *Vet Res Commun* 23:285-291
35. Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP, Dannenberg AJ (1997) Phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2 gene expression is inhibited by retinoids. *Annals of the N Y Academy of Science* 29:173-178
  36. Mohammed SI, Knapp DW, Bostwick DG, Foster RS, Khan KN, Masferrer JL, Woerner BM, Snyder PW, Koki AT (1999) Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in human invasive transitional cell carcinoma (TCC) of the urinary bladder. *Cancer Res* 59:5647-5650
  37. Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL (1995) Different intracellular locations for prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 270:10902-10908
  38. Moulton JE (1990) Tumors of the skin and soft tissues. In: JE Moulton (ed) *Tumors in domestic animals*. 3rd ed. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California, p. 23-87
  39. Müller-Decker K, Kopp-Schneider A, Marks F, Seibert K, Fürstenberger G (1998) Localization of prostaglandin H synthase isoenzymes in murine epidermal tumors: suppression of skin tumor promotion by inhibition of prostaglandin H synthase-2. *Mol Carcinog* 23:36-44
  40. Müller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmerman R, Heise H, Bayerl C, Marks F, Fürstenberger G (1999) Prostaglandin-H-

- synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int J Cancer* 82:648-656
41. Müller-Decker K, Scholz K, Marks F, Fürstenberger G (1995) Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol Carcinog* 12:31-41
  42. Nikula KJ, Benjamin SA, Angleton GM, Saunders WJ, Lee AC (1992) Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in Beagle dogs. *Radiat Res* 129:11–18
  43. Nishimura G, Yanoma S, Mizuno H, Kawakami K, Tsukuda M (1999) A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 90:1152-1162
  44. Parrett ML, Harris RE, Joarder FS, Ross MS, Clausen KP, Robertson FM (1997) Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol* 10:503-507
  45. Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KNM, Han R (1999) Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* 20:1939-1944
  46. Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, Anver M, Wang Q-H, Taylor PR (1999) Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus; an immunohistochemical survey. *Anticancer Research* 19:171-174

47. Reeve JA, DeForest ME (1988) The Canadian Kennel Club Book of Dogs. Stoddart Publishing Co. Limited, Toronto, Canada, p.803-844
48. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M (1997) Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57:1276-1280
49. Rustgi AK (1998) Cyclooxygenase-2: The future is now. *Nat Med* 7:773-774
50. Salashe SJ (2000) Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 42:S4-7
51. Scioscia KA, Snyderman CH, Rueger R, Reddy J, D'amico F, Comsa S, Collins B (1997) Role of arachidonic acid metabolites in tumor growth inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Otolaryngol* 18:1-8
52. Sirois J (1994) Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology* 135:841-848
53. Sirois J, Doré M (1997) The late induction of prostaglandin G/H synthase-2 in equine preovulatory follicles supports its role as a determinant of the ovulatory process. *Endocrinology* 138:4427-4434
54. Sirois J, Richards JS (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase

- induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* 267:6382-6388
55. Smith WL (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263:F181-191
  56. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampa A, Dannenberg AJ (1999) Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274:10911-10915
  57. Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB, Dannenberg AJ (1997) Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216:201-210
  58. Taketo MM (1998) Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* 90:1609-1620
  59. Todoroff RJ, Brodey RS (1979) Oral and pharyngeal neoplasia in the dog. *J Am Vet Assoc* 175:567-571
  60. Tremblay C, Doré M, Bochsler PN, Sirois J (1999) Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91:1398-1403
  61. Tsujii M, DuBois RN (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83:493-502
  62. Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT, Fahey III TJ (1999) Cyclooxygenase-2 expression is upregulated in human

- pancreatic cancer. *Cancer Res* 59:987-989
63. van der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Slikkerveer FJ, van Dorp DA (1979) On the haemoprotein character of prostaglandin endoperoxide synthetase. *Biochim Biophys Acta* 572:29-42
  64. Williams CS, DuBois RN (1996) Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270:G393-400
  65. Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN (2000) Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J Clin Invest* 105:1589-1594
  66. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ (1998) Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:2929-2934
  67. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58:4997-5001
  68. Ziegler J (1999) Early trials probe COX-2 inhibitors' cancer-fighting potential. *J Natl Cancer Inst* 91:1186-1187

Table 1. Characteristics of Specimens from Dogs with Squamous Cell Carcinomas

Case	Age (Years)	Breed	Sex	Site	Staining Grade*	COX-2 Intensity**
1	8	Rottweiler	M	Digit	4	++
2	4.1	Royal Poodle	F	Digit	2	++
3	6.3	German Shepherd	F	Lip	4	+++
4	8.8	Shetland	F	Gingiva	4	+++
5	3.9	Bernese Mountain	M	Digit	4	+++
6	10.5	Belgian Cattle	F	Digit	4	+++
7	6.3	Royal Poodle	F	Digit	3	++
8	8.1	Mixed breed	F	Gingiva	1	+++
9	9	Giant Schnauzer	M	Digit	2	++
10	6.2	Poodle	F	Gingiva	1	+
11	11.7	Scottish Terrier	F	Digit	3	+
12	3.5	Giant Schnauzer	M	Digit	3	++
13	9.7	German Shepherd	M	Digit	3	+++
14	11.1	Mixed breed	M	Tonsil	3	++
15	10.6	Mixed breed	M	Skin	3	++
16	7.2	Boxer	M	Mouth	2	++
17	7.5	Boxer	F	Digit	4	+++
18	11.2	Airedale	M	Digit	4	++
19	10.4	Mixed breed	M	Lip	1	++
20	11.7	Mixed breed	F	Tail	2	++
21	8.5	Doberman	F	Digit	3	+++
22	6.9	Standard Poodle	M	Digits	1	+++
23	10.5	German Shepherd	F	Digit	4	++
24	3.5	Giant Schnauzer	M	Digit	2	++
25	7.8	Giant Schnauzer	F	Digit	4	+++
26	12.8	Belgian Cattle	F	Digit	2	++
27	8.8	Mixed breed	F	Digit	4	+++
28	10.1	Mixed breed	F	Digit	4	++
29	10	German Shepherd	F	Skin	1	+++
30	7.2	Golden Retriever	F	Tail	2	++
31	6	Mixed breed	F	Skin (neck)	4	++
32	12	Mixed breed	M	Nose	3	++
33	11	Dalmatian	F	Mandible	1	+++
34	11	Schnauzer	M	Digit	3	+
35	7	Samoyede	M	Digit	4	+++
36	8	Pomeranian	F	Skin	4	++
37	8	Mixed breed	M	Skin (head)	3	++
38	8	Airedale	F	Digit	4	++
39	8.8	Royal Poodle	M	Digit	4	+++
40	5.5	Belgian Cattle	M	Digit	3	+++

\* 0 = 0 %, 1 = less than 10%, 2 = 10 to 30%, 3 = 31 to 60%, and 4 = greater than 60% of positive cells. \*\* - = no, + = weak, ++ = moderate, and +++ = strong staining.



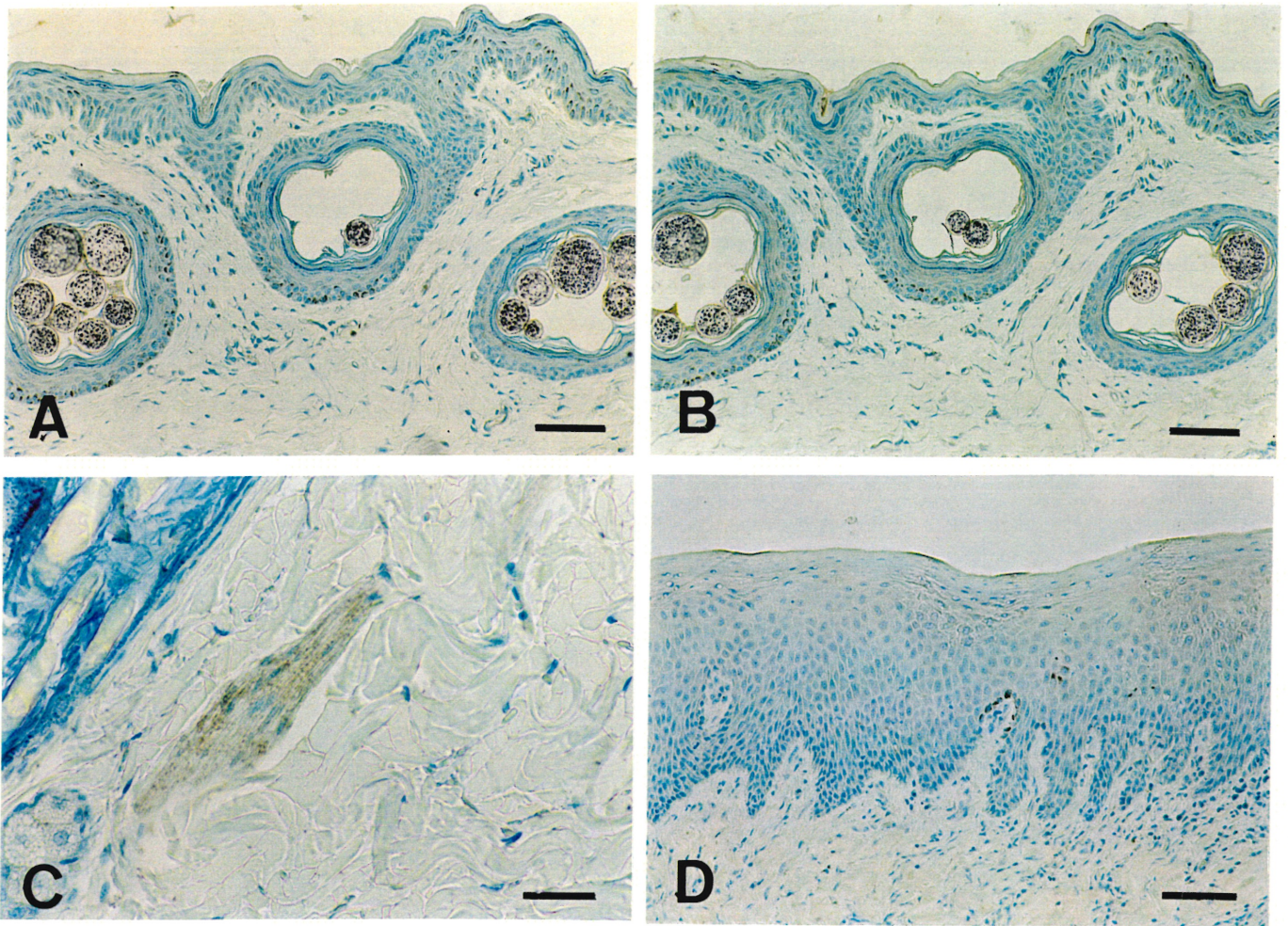


Figure 1



Figure 1. Expression of COX-1 and COX-2 by normal canine skin. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed sections of normal canine skin, as described under "Materials and Methods". Immunostaining with antibody 8223 (selective for COX-1) demonstrated no COX-1 in the epidermis or in follicle walls (A), while some COX-1 was found in smooth muscles of arrector pili muscles (C). Immunostaining with antibody MF243 (selective for COX-2) showed no reactivity in normal skin (B). Avidin biotin peroxidase complex method, Gill's hematoxylin counterstain. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$  (A, B) and 25  $\mu\text{m}$  (C).



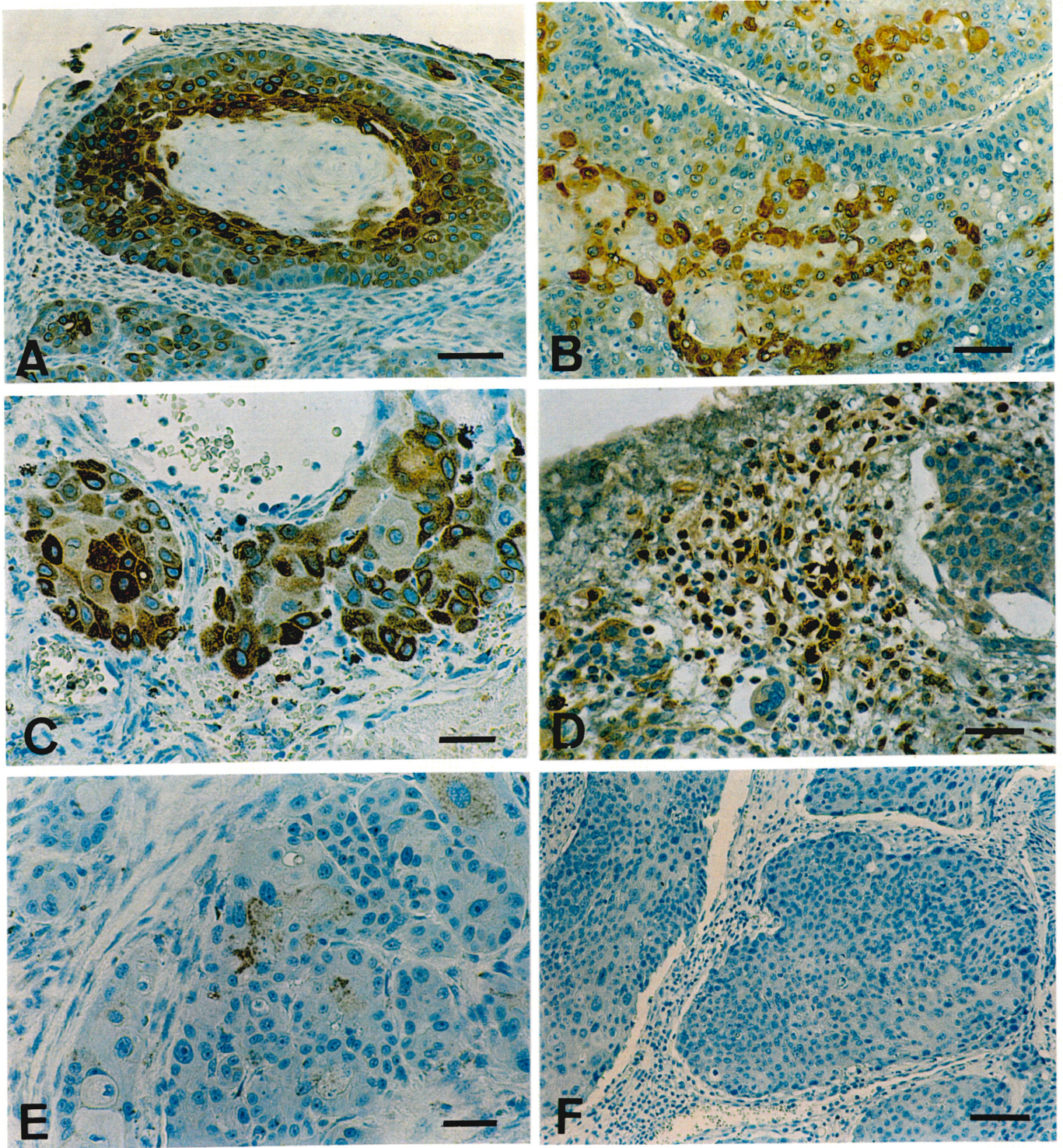


Figure 2



Figure 2. Expression of COX-1 and COX-2 by canine squamous cell carcinomas. Immunohistochemistry was performed on formalin-fixed sections of canine squamous cell carcinomas, as described under "Materials and Methods". Immunostaining with antibody MF243 (selective for COX-2) revealed the presence of COX-2 in neoplastic keratinocytes (A to D). Three different squamous cell carcinomas are shown (A is from case 39, B is from case 25, and C is from case 40, as listed in Table 1). COX-2 staining sometimes formed a discrete perinuclear halo (C). In some tumors, COX-2-staining fusiform cells were present in the stroma (E). Immunostaining with antibody 8223 (selective for COX-1) showed weak reactivity in some epithelial tumor cells in few tumors (F). Avidin biotin peroxidase complex method, Gill's hematoxylin counterstain. Scale bar = 50  $\mu$ m (A, B, E) and 25  $\mu$ m (C, D, F).

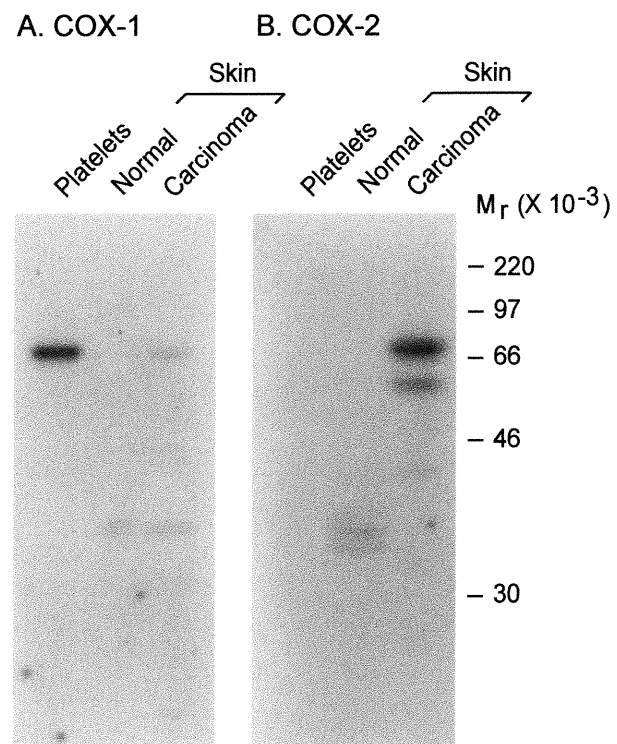
**Figure 3**

Figure 3. Immunoblot analysis of COX-1 and COX-2 isoforms in canine skin tissues. Solubilized cell extracts were prepared from normal skin, a squamous cell carcinoma (case 39; Table 1) and canine platelets, and were analyzed by one-dimensional SDS-PAGE and immunoblotting, as described under "Materials and Methods". Duplicate blots were probed with antibody 8223 (selective for COX-1, panel A) or antibody MF243 (selective for COX-2, panel B). Markers on the right indicate migration of molecular weight standards. Identical amounts of platelets (20  $\mu$ g), normal skin (100  $\mu$ g) and squamous cell carcinoma (100  $\mu$ g) were loaded in each panel. Filters A and B were exposed to film at  $-70^{\circ}\text{C}$  for 16 h.

## Discussion

Cette étude est la première rapportant l'expression de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien. Alors que la COX-2 était absente dans la peau normale, tous les cas (100%) de carcinome spinocellulaire examinés exprimaient l'enzyme. L'intensité de l'expression de la COX-2 variait entre les tumeurs, et l'enzyme était concentrée dans le cytoplasme des kératinocytes néoplasiques, plus particulièrement autour de la membrane nucléaire. Des cellules positives étaient présentes dans les tumeurs provenant de la peau, de la muqueuse orale, de la muqueuse nasale et des doigts, sans prédilection pour un site particulier. Ces résultats sont en accord avec les études démontrant une augmentation de l'ARNm de la COX-2 et de sa protéine lors de kératose actinique et de carcinomes spinocellulaires chez l'humain (Buckman et al., 1998) (Muller-Decker et al., 1999). La haute prévalence de tumeurs positives pour la COX-2 chez les chiens est aussi en accord avec une étude récente chez les humains où tous les carcinomes spinocellulaires de la tête et du cou (100%) exprimaient la COX-2 (Chan et al., 1999). La concentration périnucléaire de l'enzyme dans la plupart des cellules tumorales est aussi rapportée chez l'humain (Subbaramaiah et al., 1997). L'âge moyen des chiens atteints de carcinome spinocellulaire dans notre étude était de 8,4 ans, ce qui

correspond à environ 50 ans pour l'humain, suggérant que cette tumeur soit influencée par l'âge. Par contre, aucune prédilection de sexe n'a été observée, ce qui est aussi en accord avec des études antérieures (Rogers et al., 1995) (Buckman et al., 1998) (Salasche, 2000).

Comme chez l'humain, les radiations ultraviolettes seraient responsables du développement de la kératose actinique et de certains cas de carcinomes spinocellulaires chez le chien (Salasche, 2000) (Nikula et al., 1992). Des études ont en effet montré que l'exposition chronique à la lumière du soleil peut causer des dommages actiniques à la peau des chiens et ces dommages peuvent éventuellement conduire à la formation d'un carcinome spinocellulaire (Kitchell et al., 1995) (Madewell et al., 1981). Deux études récentes *in vitro* ont montré que l'irradiation de kératinocytes humains cause une augmentation de la protéine COX-2, ce qui suggère un rôle pour cette enzyme dans la synthèse de prostaglandines suite à une exposition aux UVB (Buckman et al., 1998) (Isoherranen et al., 1999). L'utilisation d'inhibiteurs de la COX, comme le celecoxib et l'indométhacine, a d'ailleurs réduit le développement de tumeurs de la peau induites par la lumière ultraviolette chez les souris sans poil (Fischer et al., 1999) (Pentland et al., 1999).

Selon Ananthaswamy et al. (1999), certains gènes oncosuppresseurs comme le p53 peuvent subir des mutations dans les cellules de la peau de souris irradiées par la lumière ultraviolette-B et

ces mutations du gène p53 pourraient contribuer à l'expression de la COX-2. En effet, Subbaramaiah et al. (1999) ont démontré que le p53 causait une diminution de l'expression de la COX-2 dans les fibroblastes d'embryons de souris. Lorsque l'irradiation ultraviolette de la peau induit des mutations dans le gène p53, la présence de ces formes mutantes dans les tissus tumoraux peut contribuer aux hauts niveaux de COX-2. Il est intéressant de noter que des mutations du gène p53 ont déjà été rapportées dans des cas naturels de carcinome spinocellulaire chez le chien (Gamblin et al., 1997) (Mayr et al., 1999).

La surexpression de la COX-2 a été rapportée dans plusieurs modèles de carcinogénèse de la peau chez les souris (Scioscia et al., 1997) (Snyderman et al., 1995) (Muller-Decker et al., 1998) (Malve et Fischer, 1996). Les souris atteintes de carcinomes spinocellulaires et traitées à l'aide d'inhibiteurs de la COX-2 ont présenté une inhibition significative de la croissance et une diminution du volume des tumeurs. Fischer et al. (1999) ont aussi rapporté que l'utilisation des AINSs comme le celecoxib et l'indométhacine a réduit le développement des tumeurs de la peau induites par la lumière ultraviolette chez les souris sans poil.

Bien qu'il existe plusieurs évidences génétique et pharmacologique que la COX-2 est impliquée dans les néoplasies, la contribution précise de la COX-2 dans la croissance des tumeurs n'a pas encore été élucidée. Cependant, des données suggèrent que la COX-2



peut diminuer la réponse apoptotique des cellules tumorales (Liu et al., 1998) (Williams et al., 1999) (Marks et al., 1999) (Michaluart et al., 1999) (Fischer et al., 1999) (Fischer, 1997) (Mestre et al., 1997). De plus, il semble que la COX-2 pourrait moduler indirectement l'expansion tumorale et induire l'angiogénèse *in vitro* (Williams et al., 1999) (Fosslien, 2000) . Selon Jones et al. (1999) et Shiff et Rigas (1999), la COX dans les cellules endothéliales est essentielle dans la régulation directe de l'angiogénèse. Les prostaglandines sont aussi associées avec un potentiel invasif et métastatique augmenté des cellules tumorales. Récemment, plusieurs études ont rapporté que l'augmentation de l'expression de la COX-2 est associée à des altérations du comportement cellulaire. Par exemple, Tsujii et DuBois (1995) ont montré que les cellules de l'épithélium intestinal de souris transfectées avec un vecteur de l'expression de la COX-2 sont résistantes à l'apoptose.

Les prostaglandines modulent la prolifération des cellules et la surveillance immunitaire (Mestre et al., 1997). Certaines évidences suggèrent que les prostaglandines associées aux tumeurs atténueraient les réponses immunitaires de l'hôte (Fischer, 1997) (Cross et al., 1997). C'est ainsi que l'administration d'indométhacine aux patients souffrant d'un carcinome spinocellulaire de la tête et du cou entraîne une augmentation significative du nombre de lymphocytes CD2+ dans les tumeurs (Cross et al., 1992). Ces résultats suggèrent que la production

de prostaglandines contribue à une inhibition de l'immunité cellulaire chez les patients souffrant de ce type de tumeur.

En résumé, les évidences impliquant la COX-2 dans la croissance des tumeurs sont basées sur différents modèles expérimentaux chez les animaux et sur des études épidémiologiques chez l'humain suggérant que les AINS peuvent être protecteurs contre certains cancers (Thun et al., 1991) (Marnett, 1992) (Marks et al., 1999) (Gupta et DuBois, 1998) (Ahnen, 1998). Chez le chien, une étude utilisant un AINS (piroxicam) pour le traitement de tumeurs a résulté en une rémission partielle chez trois chiens sur cinq souffrant de carcinome spinocellulaire (Knapp et al., 1992). Le même AINS a été évalué pour le traitement de 34 chiens souffrant de carcinomes de la vessie, résultant en deux rémissions complètes, quatre rémissions partielles, 18 stabilisations et 10 cas où la maladie a progressé (Knapp et al., 1994). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la synthèse des prostaglandines par les AINSs peut contribuer aux stratégies de prévention et de traitement de cancers comme le carcinome spinocellulaire.

## Conclusion

Ce projet a permis de déterminer que les isoenzymes de la COX sont exprimées dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien, d'identifier les isoformes impliquées et de déterminer leur localisation cellulaire. L'étude d'immunohistochimie a montré qu'aucune ou très peu de COX-2 est présente dans la peau normale, tandis que tous les cas (100%) de carcinome spinocellulaire examinés ont exprimé l'enzyme COX-2. Des cellules positives ont été retrouvées dans les cas des tumeurs provenant de la peau, de la muqueuse orale, de la muqueuse nasale et des doigts, sans prédilection pour un site spécifique. Des analyses d'immunobuvardage de type Western ont confirmé l'expression spécifique de la COX-2 seulement dans les carcinomes spinocellulaires.

Cette étude révèle pour la première fois que la COX-2 est induite dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien. D'autres approches expérimentales pourraient être utilisées pour déterminer le rôle et caractériser la régulation de l'expression du gène de la COX-2 dans les carcinomes spinocellulaires chez le chien. Par exemple, il sera utile de caractériser l'expression de la COX-2 dans des cultures de kératinocytes canins normaux et néoplasiques et d'effectuer une analyse comparative de l'effet de plusieurs agonistes sur l'expression de la COX-2 dans ces cultures. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la COX-2 pourrait

démontrer la relation entre l'induction de la synthèse de prostaglandines, l'expression de la COX-2 et le comportement cellulaire.

## Bibliographie

- Ahnen DJ, 1998. Colon cancer prevention by NSAIDs: what is the mechanism of action? *Eur J Surg Suppl* 111-114.
- Ananthaswamy HN, Ullrich SE, Mascotto RE, Fourtanier A, Loughlin SM, Khaskina P, Bucana CD and Kripke ML, 1999. Inhibition of solar simulator-induced p53 mutations and protection against skin cancer development in mice by sunscreens. *J Invest Dermatol* 112 763-768.
- Aydin Y, Toplu N and Alkan Z, 1997. Squamous cell carcinoma of the lung in a dog. *Aust Vet J* 75 488-490.
- Bajdik CD, Gallagher RP, Hill GB and Fincham S, 1998. Sunlight exposure, hat use, and squamous cell skin cancer on the head and neck. *J Cutan Med Surg* 3 68-73.
- Beani JC, 1996. [Screening for cutaneous carcinoma]. *Bull Cancer* 83 755-757.
- Brooks MB, Matus RE, Leifer CE, Alfieri AA and Patnaik AK, 1988. Chemotherapy versus chemotherapy plus radiotherapy in the treatment of tonsillar squamous cell carcinoma in the dog. *J Vet Intern Med* 2 206-211.
- Buckman SY, Gresham A, Hale P, Hruza G, Anast J, Masferrer J and Pentland AP, 1998. COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis* 19 723-729.

Burk RL, 1996. Radiation therapy in the treatment of oral neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 26 155-163.

Carpenter L.G., Withrow S.J., Powers B.E., Ogilvie G.K., Schwarz P.D., Straw R.C., Larue S.M., and Berg J. squamous cell carcinoma of the tongue in 10 dogs. *Journal of American Animal Hospital Association* 29 17-24. 2000. (GENERIC)

Ref Type: Generic

Chan G, Boyle JO, Yang EK, Zhang F, Sacks PG, Shah JP, Edelstein D, Soslow RA, Koki AT, Woerner BM, Masferrer JL and Dannenberg AJ, 1999. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59 991-994.

Christophers AJ, 1998. Melanoma is not caused by sunlight. *Mutat Res* 422 113-117.

Corona R, 1996. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer: a review. *Ann Ist Super Sanita* 32 37-42.

Cross DS, Platt JL, Juhn SK, Bach FH and Adams GL, 1992.

Administration of a prostaglandin synthetase inhibitor associated with an increased immune cell infiltrate in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 118 526-528.

Cross DS, Platt JL, Juhn SK, Bach FH and Adams GL, 1997. Tumor infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: mechanisms of enhancement using prostaglandin synthetase inhibitors. *Adv Exp Med Biol* 400B 1013-1024.

Dagli ML, Calderaro FF, Silva MT and Guerra JL, 1997. Squamous cell carcinoma of the renal pelvis with metastasis in a dog. *J Comp Pathol* 116 397-402.

Dhaliwal RS, Kitchell BE, and Marreta SM. Oral Tumors in Dogs and Cats. Part I. Diagnosis and Clinical Signs. *The Compendium* 20 1011-1021. 1998 (a).

Dhaliwal RS, Kitchell BE, and Marreta SM. Oral Tumors in Dogs and Cats. Part II. Prognosis and Treatment. *The Compendium* 20 1109-1119. 1998 (b).

Ettinger S.J. and Feldman E.C., 2000. *Textbook of Veterinary Internal Medicine - Diseases of the Dog and Cat*, Philadelphia:

Finnie JW and Bostock DE, 1979. Skin neoplasia in dogs [letter]. *Aust Vet J* 55 602-604.

Fischer SM, 1997. Prostaglandins and Cancer. *Front Biosci* 2 d482-d500.

Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA and Conti CJ, 1999. Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Mol Carcinog* 25 231-240.

Fosslien E, 2000. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 30 3-21.

- Gamblin RM, Sagartz JE and Couto CG, 1997. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *Am J Vet Res* 58 857-863.
- Gardner DG, 1996. Spontaneous squamous cell carcinomas of the oral region in domestic animals: a review and consideration of their relevance to human research. *Oral Dis* 2 148-154.
- Goldschmidt MH and Shofer FS, 1992. Squamous Cell Carcinoma. In: Goldschmidt MH, Shofer FS, *Skin Tumors of the Dog and Cat*. Oxford: Pergamon Press, pp 37-49
- Goldschmidt MH, 1984. Basal- and squamous-cell neoplasms of dogs and cats. *Am J Dermatopathol* 6 199-206.
- Green A, Whiteman D, Frost C and Battistutta D, 1999. Sun exposure, skin cancers and related skin conditions. *J Epidemiol* 9 S7-13.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S and Wingo PA, 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 50 7-33.
- Gupta RA and DuBois RN, 1998. Aspirin, NSAIDS, and colon cancer prevention: mechanisms? *Gastroenterology* 114 1095-1098.
- Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG and Mukhtar H, 2000. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate* 42 73-78.
- Hargis AM and Thomassen RW, 1979. Animal model: solar dermatosis (keratosis) and solar dermatosis with squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 94 193-196.



- Haziroglu R and Saglam M, 1989. Squamous cell carcinoma in a puppy. *J Comp Pathol* 101 221-223.
- Higashi Y, Kanekura T and Kanzaki T, 2000. Enhanced expression of cyclooxygenase (COX)-2 in human skin epidermal cancer cells: evidence for growth suppression by inhibiting COX-2 expression. *Int J Cancer* 86 667-671.
- Isoherranen K, Punnonen K, Jansen C and Uotila P, 1999. Ultraviolet irradiation induces cyclooxygenase-2 expression in keratinocytes. *Br J Dermatol* 140 1017-1022.
- Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ and Tarnawski AS, 1999. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5 1418-1423.
- Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA and Mott LA, 1999. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. New Hampshire Skin Cancer Study Group. *Int J Cancer* 81 555-559.
- Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA and Jothy S, 1995. Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res* 55 2556-2559.
- Katz MH, 1997. Nonmelanoma skin cancer. *Md Med J* 46 239-242.
- Kitchell BK, Orenberg EK, Brown DM, Hutson C, Ray K, Woods L and Luck E, 1995. Intralesional sustained-release chemotherapy with

therapeutic implants for treatment of canine sun-induced squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 31A 2093-2098.

Knapp DW, Richardson RC, Bottoms GD, Teclaw R and Chan TC, 1992. Phase I trial of piroxicam in 62 dogs bearing naturally occurring tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 29 214-218.

Knapp DW, Richardson RC, Chan TC, Bottoms GD, Widmer WR, DeNicola DB, Teclaw R, Bonney PL and Kuczek T, 1994. Piroxicam therapy in 34 dogs with transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *J Vet Intern Med* 8 273-278.

Komhoff M, Guan Y, Shappell HW, Davis L, Jack G, Shyr Y, Koch MO, Shappell SB and Breyer D, 2000. Enhanced expression of cyclooxygenase-2 in high grade human transitional cell bladder carcinomas. *Am J Pathol* 157 29-35.

Krahwinkel DJJ, 1980. Cryosurgical treatment of skin diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 10 787-801.

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW and Herschman HR, 1991. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266 12866-12872.

Latimer KS, Kaswan RL and Sundberg JP, 1987. Corneal squamous cell carcinoma in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 190 1430-1432.

Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A and Levine AC, 1998. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-

regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res* 58 4245-4249.

Lord RV, Danenberg KD and Danenberg PV, 1999. Cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus, Barrett's adenocarcinomas, and esophageal SCC: ready for clinical trials. *Am J Gastroenterol* 94 2313-2315.

MacEwen EG, 1990. Spontaneous tumors in dogs and cats: models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer Metastasis Rev* 9 125-136.

Madewell BR, Conroy JD and Hodgkins EM, 1981. Sunlight-skin cancer association in the dog: a report of three cases. *J Cutan Pathol* 8 434-443.

Madewell BR, Pool RR, Theilen GH and Brewer WG, 1982. Multiple subungual squamous cell carcinomas in five dogs. *J Am Vet Med Assoc* 180 731-734.

Maldve RE and Fischer SM, 1996. Multifactor regulation of prostaglandin H synthase-2 in murine keratinocytes. *Mol Carcinog* 17 207-216.

Marino DJ, Matthiesen DT, Stefanacci JD and Moroff SD, 1995. Evaluation of dogs with digit masses: 117 cases (1981-1991). *J Am Vet Med Assoc* 207 726-728.

Marks F, Furstenberger G and Muller-Decker K, 1998. Arachidonic acid metabolism as a reporter of skin irritancy and target of cancer chemoprevention. *Toxicol Lett* 96-97 111-118.

Marks F, Furstenberger G and Muller-Decker K, 1999. Metabolic targets of cancer chemoprevention: interruption of tumor development by inhibitors of arachidonic acid metabolism. *Recent Results Cancer Res* 151 45-67.

Marks R, 1995. The epidemiology of non-melanoma skin cancer: who, why and what can we do about it. *J Dermatol* 22 853-857.

Marmor JB, Pounds D, Hahn N and Hahn GM, 1978. Treating spontaneous tumors in dogs and cats by ultrasound-induced hyperthermia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 4 967-973.

Marnett LJ, 1992. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 52 5575-5589.

Matsuura H, Sakaue M, Subbaramaiah K, Kamitani H, Eling TE, Dannenberg AJ, Tanabe T, Inoue H, Arata J and Jetten AM, 1999. Regulation of cyclooxygenase-2 by interferon gamma and transforming growth factor alpha in normal human epidermal keratinocytes and squamous carcinoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 274 29138-29148.

Mayer SJ, 1992. Stratospheric ozone depletion and animal health. *Vet Rec* 131 120-122.

Mayr B, Reifinger M and Alton K, 1999. Novel canine tumour suppressor gene p53 mutations in cases of skin and mammary neoplasms. *Vet Res Commun* 23 285-291.

Meleo KA, 1997. Tumors of the skin and associated structures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 27 73-94.

- Mestre JR, Chan G, Zhang F, Yang EK, Sacks PG, Boyle JO, Shah JP, Edelstein D, Subbaramaiah K and Dannenberg AJ, 1999. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer. *Ann N Y Acad Sci* 889 62-71.
- Mestre JR, Subbaramaiah K, Sacks PG, Schantz SP and Dannenberg AJ, 1997. Phorbol ester-mediated induction of cyclooxygenase-2 gene expression is inhibited by retinoids. *Ann N Y Acad Sci* 833 173-178.
- Michaluart P, Masferrer JL, Carothers AM, Subbaramaiah K, Zweifel BS, Koboldt C, Mestre JR, Grunberger D, Sacks PG, Tanabe T and Dannenberg AJ, 1999. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* 59 2347-2352.
- Moore AS, Theilen GH, Newell AD, Madewell BR and Rudolf AR, 1991. Preclinical study of sequential tumor necrosis factor and interleukin 2 in the treatment of spontaneous canine neoplasms. *Cancer Res* 51 233-238.
- Muller-Decker K, Kopp-Schneider A, Marks F, Seibert K and Furstenberger G, 1998. Localization of prostaglandin H synthase isoenzymes in murine epidermal tumors: suppression of skin tumor promotion by inhibition of prostaglandin H synthase-2. *Mol Carcinog* 23 36-44.
- Muller-Decker K, Reinerth G, Krieg P, Zimmermann R, Heise H, Bayerl C, Marks F and Furstenberger G, 1999. Prostaglandin-H-synthase isozyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int J Cancer* 82 648-656.

- Muller-Decker K, Scholz K, Marks F and Furstenberger G, 1995. Differential expression of prostaglandin H synthase isozymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Mol Carcinog* 12 31-41.
- Muller-Decker K, Scholz K, Neufang G, Marks F and Furstenberger G, 1998. Localization of prostaglandin-H synthase-1 and -2 in mouse skin: implications for cutaneous function. *Exp Cell Res* 242 84-91.
- Muller GH, 1967. Basal cell epithelioma and squamous cell carcinoma in animals. *Arch Dermatol* 96 386-389.
- Nikula KJ, Benjamin SA, Angleton GM, Saunders WJ and Lee AC, 1992. Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in beagle dogs. *Radiat Res* 129 11-18.
- O'Brien MG, Berg J and Engler SJ, 1992. Treatment by digital amputation of subungual squamous cell carcinoma in dogs: 21 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 201 759-761.
- Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF and Taketo MM, 1996. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87 803-809.
- Owen LN, 1976. Therapy of neoplasia in domestic animals. *Adv Vet Sci Comp Med* 20 223-252.
- Paradis M, Scott DW and Breton L, 1989. Squamous cell carcinoma of the nail bed in three related giant schnauzers. *Vet Rec* 125 322-324.

Pei Y, Barber LA, Murphy RC, Johnson CA, Kelley SW, Dy LC, Fertel RH, Nguyen TM, Williams DA and Travers JB, 1998. Activation of the epidermal platelet-activating factor receptor results in cytokine and cyclooxygenase-2 biosynthesis. *J Immunol* 161 1954-1961.

Pentland AP, Schoggins JW, Scott GA, Khan KN and Han R, 1999. Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis* 20 1939-1944.

Prescott SM and Fitzpatrick FA, 2000. Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1470 M69-M78.

Ratnasinghe D, Tangrea J, Roth MJ, Dawsey S, Hu N, Anver M, Wang QH and Taylor PR, 1999. Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus; an immunohistochemical survey. *Anticancer Res* 19 171-174.

Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P and Harkonen M, 1997. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57 1276-1280.

Rogers KS, Helman RG and Walker MA, 1995. Squamous cell carcinoma of the canine nasal planum: eight cases (1988-1994). *J Am Anim Hosp Assoc* 31 373-378.

Salasche SJ, 2000. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 42 4-7.

Scioscia KA, Snyderman CH, Rueger R, Reddy J, D'Amico F, Comsa S and Collins B, 1997. Role of arachidonic acid metabolites in tumor

growth inhibition by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Am J Otolaryngol* 18 1-8.

Shamma A, Yamamoto H, Doki Y, Okami J, Kondo M, Fujiwara Y, Yano M, Inoue M, Matsuura N, Shiozaki H and Monden M, 2000. Up-regulation of cyclooxygenase-2 in squamous carcinogenesis of the esophagus. *Clin Cancer Res* 6 1229-1238.

Shapiro W, Kitchell BE, Fossum TW, Couto CG and Theilen G, 1988. Cisplatin for treatment of transitional cell and squamous cell carcinomas in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 193 1530-1533.

Shiff SJ and Rigas B, 1999. Aspirin for cancer. *Nat Med* 5 1348-1349.

Snyderman CH, Abbas MM, Wagner R and D'Amico F, 1995. Inhibition of growth of a murine squamous cell carcinoma by a cyclooxygenase inhibitor increases leukotriene B4 production. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121 1017-1020.

Strafuss AC, Cook JE and Smith JE, 1976. Squamous cell carcinoma in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 168 425-427.

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A and Dannenberg AJ, 1999. Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J Biol Chem* 274 10911-10915.

Subbaramaiah K, Zakim D, Weksler BB and Dannenberg AJ, 1997. Inhibition of cyclooxygenase: a novel approach to cancer prevention. *Proc Soc Exp Biol Med* 216 201-210.



- Taketo MM, 1998. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (part I).  
J Natl Cancer Inst 90 1529-1536.
- Taketo MM, 1998. Cyclooxygenase-2 inhibitors in tumorigenesis (Part II).  
J Natl Cancer Inst 90 1609-1620.
- Thrall DE and Biery DN, 1977. Principles and application of radiation therapy. Vet Clin North Am 7 35-49.
- Thun MJ, Namboodiri MM and Heath CWJ, 1991. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. N Engl J Med 325 1593-1596.
- Tjandrawinata RR, Dahiya R and Hughes-Fulford M, 1997. Induction of cyclo-oxygenase-2 mRNA by prostaglandin E2 in human prostatic carcinoma cells. Br J Cancer 75 1111-1118.
- Tremblay C, Dore M, Bochsler PN and Sirois J, 1999. Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma. J Natl Cancer Inst 91 1398-1403.
- Tsujii M and DuBois RN, 1995. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. Cell 83 493-501.
- Tucker ON, Dannenberg AJ, Yang EK, Zhang F, Teng L, Daly JM, Soslow RA, Masferrer JL, Woerner BM, Koki AT and Fahey TJ, 1999. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. Cancer Res 59 987-990.
- Vane JR and Botting RM, 1998. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Am J Med 104 2S-8S.

Walder EJ, 1995. Comparative aspects of nonmelanoma skin cancer.  
Clin Dermatol 13 569-578.

White SD, 1994. Diseases of the nasal planum. Vet Clin North Am Small  
Anim Pract 24 887-895.

Williams CS, Mann M and DuBois RN, 1999. The role of  
cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development.  
Oncogene 18 7908-7916.

Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS and Meltzer SJ, 1998. Increased  
expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in  
Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. Cancer Res  
58 2929-2934.

Wunsch H, 1998. COX provides missing link in mechanism of aspirin in  
colon cancer. Lancet 351 1864.

Zimmermann KC, Sarbia M, Weber AA, Borchard F, Gabbert HE and  
Schror K, 1999. Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal  
carcinoma. Cancer Res 59 198-204.