

## Verbeterde tumoridentificatie, -prognose en -therapieopvolging met immunohistochemie

K. Chiers, G. Vercauteren, R. Ducatelle

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, UGent, Salisbury-laan 33, B-9820 Merelbeke

### SAMENVATTING

**Immunohistochemie is een techniek waarbij gebruik gemaakt wordt van specifieke antistoffen om eiwitten te visualiseren in histologische weefselsneden. Tijdens de tumorprogressie treden mutaties op die vaak aanleiding geven tot een abnormale expressie van eiwitten. Ze worden geassocieerd met onder andere kwaadaardigheid, een invasief/metastaserend vermogen en de overlevingstijd van de patiënt. Deze "tumormerkers" zijn dan ook onmisbaar geworden in de tumordiagnostiek. Sommige merkers bepalen ook de gevoeligheid van de tumor voor (chemo)therapie.**

### INLEIDING

Tot op heden blijft het histologisch onderzoek de gouden standaard voor het stellen van de diagnose en het identificeren van een tumoraal proces. Over het algemeen gebruikt men hiervoor morfologisch waarneembare kenmerken van hematoxyline-eosine (HE) gekleurde coupes om de cel van oorsprong te bepalen. Hierbij gaat men na in hoeverre de neoplastische cellen nog te herkennen zijn, zoals bijvoorbeeld spino-cellulaire epitheelcellen, vetcellen, osteoblasten, melanocyten, enz. Daarnaast wordt het biologisch gedrag van het tumoraal proces nagegaan. Belangrijke kenmerken, zoals differentiatiegraad, mitose-index, pleiomorfisme van de cellen en kernen, necrose, invasief en metastaserend vermogen worden hiervoor gehanteerd. In het beste geval kan de tumor worden benoemd en een prognose worden vooropgesteld. De naam van een neoplastisch proces bestaat uit een combinatie van de cel van oorsprong en het biologisch gedrag (goedaardig epitheliaal en mesenchymaal: -oma; kwaadaardig epitheliaal: -carcinoma; kwaadaardig mesenchymaal: -sarcoma). Gekende voorbeelden zijn squameuscelcarcinoom en osteosarcoma als kwaadaardige tumoren respectievelijk van de opperhuid (spino-cellulaire cellen) en het bot (osteoblasten).

Histochemische kleuringen worden aangewend om een tumor verder te karakteriseren. Een Giemsa-kleuring wordt aangewend om mastcellen te identificeren via het metachromatisch aankleuren van de granulen. Periodic acid-schiff (PAS) kleuring kan worden gebruikt om mucinen aan te kleuren bij tumoren van klierweefsel (bijvoorbeeld colorectale adenocarcinoma's). Een Gieson-kleuring zal het collageen dat werd geproduceerd door bijvoorbeeld tumorale fibroblasten rood aankleuren. Een zilverkleuring kan worden uitgevoerd om "argyrophilic nucleolar organizer regions" (AgNOR) te visualiseren waardoor een idee wordt bekomen omtrent het proliferatieritme van een tumor.

In de laatste decennia is de tumorpathologie evenwel ingrijpend veranderd door het gebruik van immunohistochemie (Ducatelle *et al.*, 1985). Bij deze techniek maakt men gebruik van antistoffen om epitopen van specifieke eiwitten aan te kleuren. De basis werd gelegd in 1941 door Coons *et al.*, maar vond pas een 50-tal jaar later haar algemene intrede in de pathologie na een aanpassing voor met formol gefixeerde en met paraffine ingebedde coupes. De techniek heeft als voordeel dat retrospectieve studies kunnen worden uitgevoerd, dat ze een hoge specificiteit en sensitiviteit bezit, dat bijna elke immunogene molecule kan worden aangetoond en dat ze geëvalueerd kan worden tegenover een morfologische achtergrond, waarmee pathologen het meest vertrouwd zijn. De techniek heeft natuurlijk ook nadelen omdat niet alle antigenen specifiek voor één cel zijn, kruisreacties tussen niet-verwante antigenen kunnen ontstaan, er een specifieke absorptie van antigenen kan optreden en antigenen uit een normale cel kunnen diffunderen en door een naburige neoplastische cel worden opgenomen. Het is dan ook aan de patholoog om over voldoende kennis en ervaring te beschikken om niet in deze "valkuilen" te trappen en een correcte interpretatie te maken.

Immunohistochemie wordt niet alleen gebruikt om de mechanismen die aanleiding geven tot het ontstaan van tumoren te onderzoeken, ze wordt eveneens gebruikt om het celtypen van oorsprong te achterhalen, om een prognose te kunnen vooropstellen en om metastatische neoplastische cellen aan te tonen. De techniek wordt tegenwoordig ook aangewend om een therapie bij te sturen.

### ONDERZOEK NAAR MECHANISMEN IN CARCINOGENESE

Het ontstaan van tumoren is een meerstapsproces waarbij multiële genetische veranderingen gebeuren. Een tumoraal proces wordt dan ook als kwaadaardig

beschouwd indien er zich 6 fundamentele wijzigingen voordoen in de cellen. De cel 1) wordt onafhankelijk van groeifactoren, 2) wordt ongevoelig voor groei-inhiberende factoren, 3) ontsnapt aan apoptose, 4) overwint het cellulair verouderingsproces, 5) verwerft angiogenetische eigenschappen en 6) bezit een invasie- en metastaseringsvermogen.

Mutaties in genen die de celcyclus regelen (oncogenen en antioncogenen) leiden vaak tot een gewijzigde expressie van het overeenstemmende proteïne en kunnen bijgevolg immunohistochemisch worden aangetoond. Voorbeelden daarvan zijn de groeifactor platelet-derived growth factor-beta bij caniene osteosarcomen (Levine, 2002), de epidermale groeifactor-receptor c-erbB-2 in caniene melkkliertumoren (Dutra *et al.*, 2004), P-catenine betrokken in de signaaltransductie in caniene melkkliertumoren (Restucci *et al.*, 2007), de nucleaire factor c-MYC in caniene melanoma's (Ahern *et al.*, 1993), het celcyclusregelend eiwit cycline D1 in caniene cutane mastceltumoren (Ozaki *et al.*, 2007) en de antioncogenen p53 en Rb (Keller *et al.*, 2007; Koenig *et al.*, 2002). Het ontsnappen aan apoptose kan ondermeer gebeuren door een verhoogde expressie van eiwitten die de apoptosecascade inhiberen. Een belangrijk eiwit hierbij is het Bcl-2 dat in verschillende tumoren kan worden waargenomen waaronder bijvoorbeeld caniene lymfoma's (Sano *et al.*, 2003). Neoplastische cellen kunnen een onbeperkte replicatiecapaciteit verkrijgen door de reactivering van het telomerase-enzym en overwinnen op die manier het cellulair "verouderingsproces". Dit proces is zeer essentieel in de tumorprogressie. Bij de mens vindt men dit terug bij meer dan 90% van de tumoren (Shay and Bacchetti, 1997). Ook bij de hond vindt men vaak telomeraseactiviteit in neoplastische cellen (Nasir, 2008).

Hogergenoemde factoren zijn evenwel maar een kleine bloemlezing uit de talrijke genen die betrokken kunnen zijn bij het ontstaan van een neoplastisch proces. Bij de overgrote meerderheid van tumoren worden verschillende genen aangetast. Bij de mens is bij 50% van de kwaadaardige tumoren het p53-gen gemuteerd is. Mutaties in de genen die coderen voor p16, cycline D, CDK4 en Rb worden eveneens vaak waargenomen (Kumar *et al.*, 2005).

#### IDENTIFICATIE VAN DE CEL VAN OORSPRONG

Het bepalen van de cel van oorsprong bij tumoren is niet enkel van academisch belang, een accurate diagnose is immers noodzakelijk om een aangepaste behandeling te kunnen instellen. Bij histologisch onderzoek van HE-gekleurde weefselcoups tracht men in de eerste plaats de differentiatie (epitheliaal, mesenchymaal, neuro-endocrien, hematopoëtisch) van de neoplastische cellen na te gaan. Hiertoe gaat de patholoog op zoek naar kenmerken die een bepaalde richting aanwijzen: eilandjes van grote cellen in een fibreus stroma (epitheliaal), bundels van spoelvormige cellen (mesenchymaal), nestjes van cellen omgeven door fijne fibrovasculaire septa (endocrien) of een op-

eenhoping van rondcellen (hematopoëtisch). Evenwel zijn de tumorale cellen vaak weinig gedifferentieerd en kunnen ze niet in één van hogergenoemde klassen worden ingedeeld.

De neoplastische cellen brengen echter in de meeste gevallen eiwitten tot expressie die specifiek zijn voor de cel van oorsprong. Gebruikmakend van specifieke antistoffen (= merker) kunnen deze cellen bijgevolg geïdentificeerd worden. Eén enkele merker volstaat evenwel niet altijd en een panel van antistoffen die elkaar aanvullen, dient dan ook te worden gebruikt. Bij het gebruik van een dergelijk panel kan inderdaad een differentiatie gedetecteerd worden bij meer dan 90% van de tumoren. Dit percentage ligt veel lager wanneer slechts 1 merker wordt gebruikt (Bahrami *et al.*, 2008). Een gestandaardiseerde set van antistoffen waarmee alle tumoren kunnen geïdentificeerd worden bestaat echter niet. In de praktijk komt het er evenwel vaak op neer om per tumor een geïndividualiseerd panel te construeren. Bovendien dient een definitieve diagnose gesteld te worden in combinatie met de tumormorfologie, de anatomische lokalisatie en klinische/radiologische bevindingen.

#### Merkers voor epitheliale origine

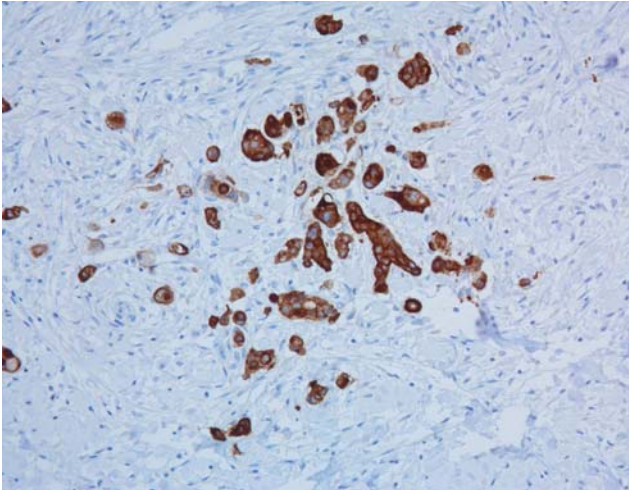
Cytokeratinen zijn intermediaire filamenten die in hoofdzaak aanwezig zijn in epitheliale cellen (onder andere epidermis en klieren). Er bestaan 20 verschillende typen van cytokeratinen waarvan enkele subtypen specifiek in een bepaald type van epitheliale cellen aanwezig zijn. De bepaling van het type cytokeratine kan dus een hulp zijn voor een nauwkeurigere bepaling van de tumor oorsprong. Een merker die frequent wordt gebruikt in de screening herkent evenwel alle typen cytokeratinen (pancytokeratinemerker) (Figuur 1). Antistoffen tegenover epitheliaal membraan antigeen kunnen additioneel worden aangewend om een epitheliale differentiatie aan te tonen. Dit wordt in de diergeneeskunde echter zeer weinig gebruikt.

#### Merkers voor mesenchymale origine

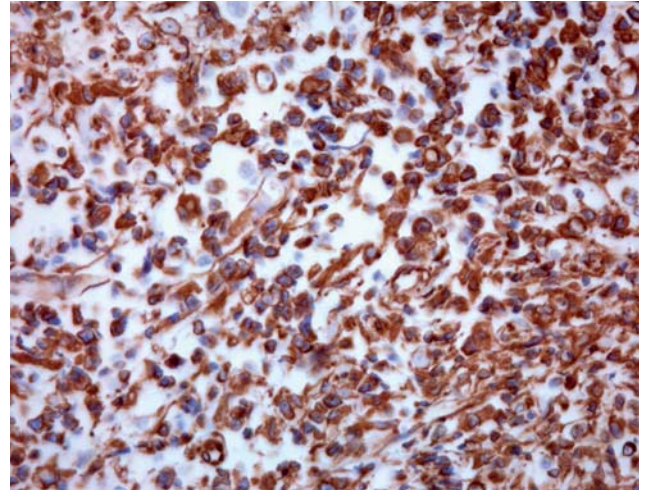
Vimentine is het enige intermediaire filament dat kenmerkend is voor cellen van mesenchymale oorsprong. Het wordt tot expressie gebracht in bijna alle sarcoma's en melanoma's en is variabel in lymfoma's (Figuur 2). Deze merker is evenwel niet uitsluitend specifiek voor mesenchymale tumoren daar vimentine vaak samen tot expressie wordt gebracht met cytokeratine in carcinoma's. Voorbeelden van dergelijke co-expressie zijn prostaatcarcinoma, meningioma en mesothelioma bij de hond en gemengde tumoren (carcinosarcomas) (Brower *et al.*, 2006; da Cunha *et al.*, 2007, Montoliu *et al.*, 2006).

#### Merkers voor neuro-endocriene origine

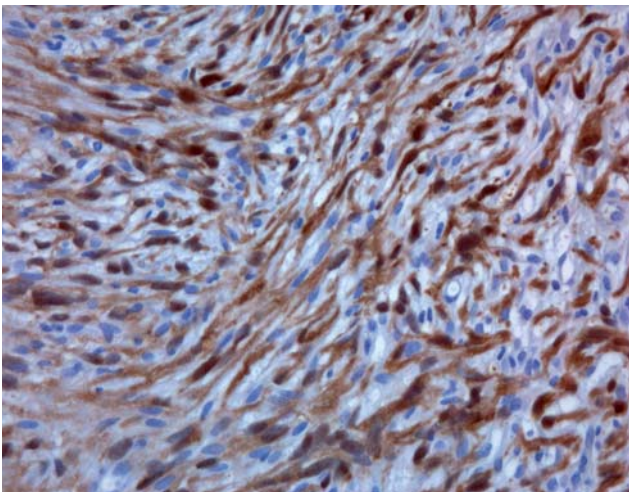
De 2 meest betrouwbare merkers voor neuro-endocriene tumoren zijn synaptofysine en chromogranine. Deze worden dan ook vaak complementair



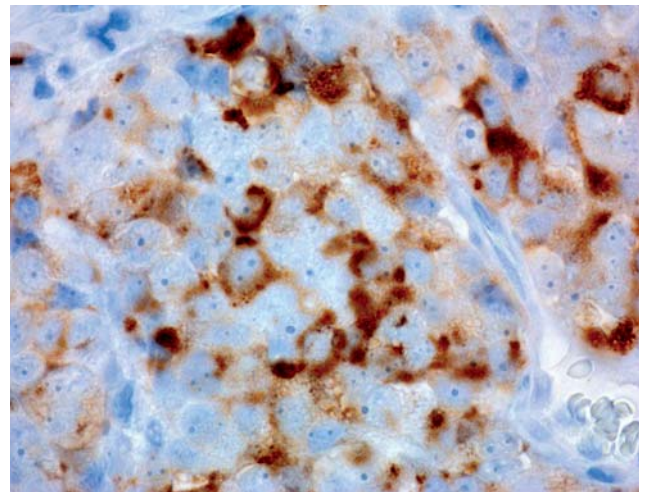
**Figuur 1.** Pancytokeratine merker, overgangscel carcinoma in de blaas van een hond. Groepjes van epitheliale cellen (bruin) groeien invasief in een fibreus stroma.



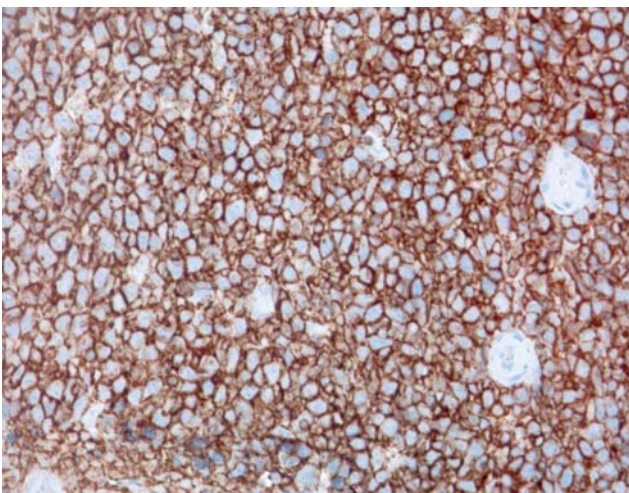
**Figuur 2.** Vimentinemerker, hooggradig fibrosarcoma in de subcutis van een kat. Intracytoplasmatische aankleuring van het intermediair filament.



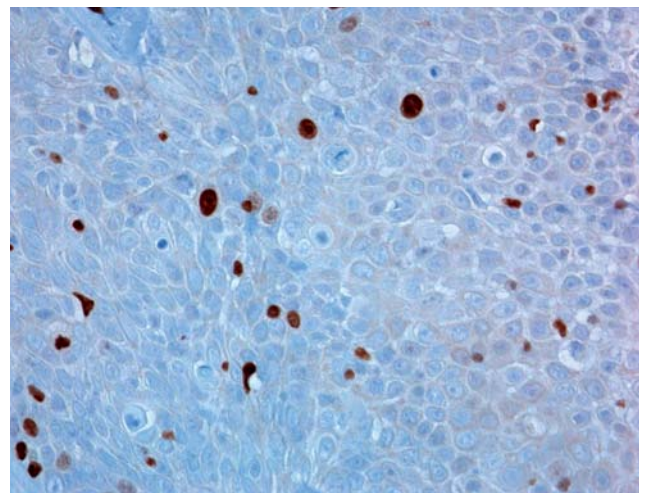
**Figuur 3.** S100-merker, peripheral nerve sheath tumor in de staartbasis van een paard. Positieve intracytoplasmatische aankleuring bij neoplastische spoelvormige cellen.



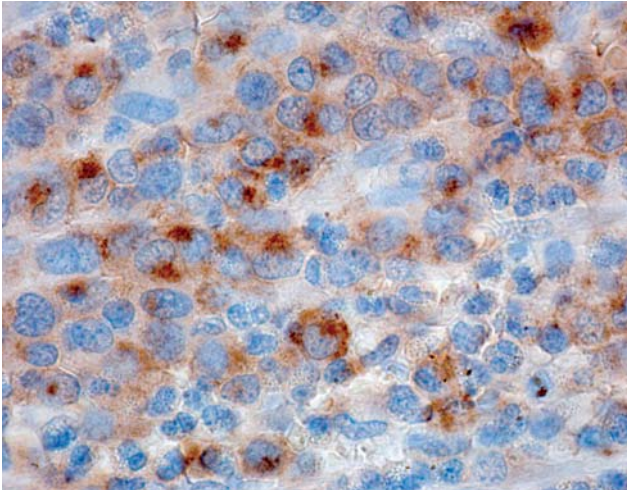
**Figuur 4.** Melan A-merker, canien oraal amelanotisch melanoma. De tumorale melanocyten kleuren positief aan.



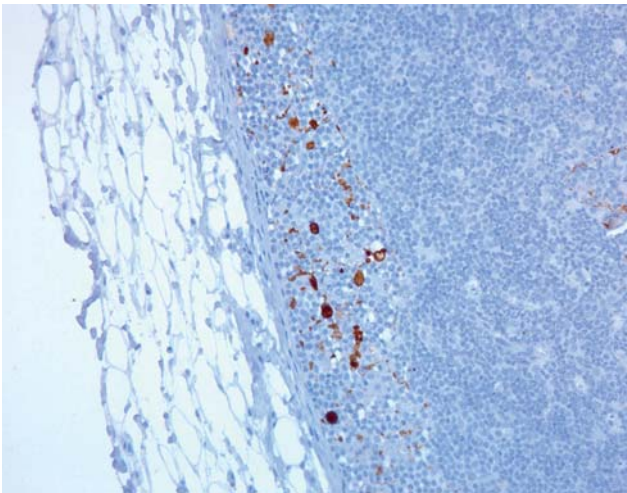
**Figuur 5.** CD79a-merker, B-cellymfoma in de milt van een kat. Membranaire aankleuring van tumorale lymfocyten.



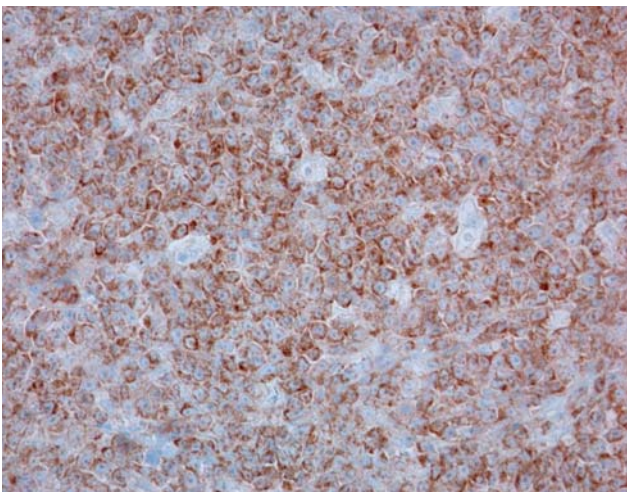
**Figuur 6.** Ki67-merker, intraosseus carcinoma in de maxilla van een paard. Het hoog aantal bruin aankleurende kernen wijst op een hoog proliferatieritme.



**Figuur 7.** c-kitmerker, mastceltumor graad III in de huid van een hond. Intracytoplasmatische expressie van de tyrosine kinasereceptor c-kit in neoplastische mastcellen.



**Figuur 8.** Pancytokeratine merker in de liesplooilymfeknoop van een hond. In de subcapsulaire sinussen zijn tumorcelemboli (metastasen van een melkklertumor) aanwezig.



**Figuur 9.** P-glycoproteïne merker, lymfoma in de mesenteriale lymfeknoop van een kat. De grote meerderheid van neoplastische lymfocyten bezit een membranaire expressie van het permeabiliteitsglycoproteïne.

gebruikt voor het aantonen van chemodectoma's, feochromocytoma's, neuroblastoma's (Barthez *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2003; Forrest *et al.*, 1997). Daarnaast wordt vaak neuronspecifieke enolase gebruikt. Zowel synaptofysine als neuronspecifieke enolase kan eveneens tot expressie worden gebracht in neuronen.

Alhoewel melanocyten neuro-endocriene functies bezitten, kleuren ze enkel in specifieke gevallen aan met synaptofysine en chromogranine (Eyden *et al.*, 2005). Een betere merker voor melanoma's is S100 (Figuur 3) (Smith *et al.*, 2002). S100-antistoffen reageren met een groep van 20 verschillende calciumbindende proteïnen met diverse functies. De eiwitten worden tot expressie gebracht in melanocyten, Schwanncellen, gliacellen, chondrocyten, adipocyten, myoepitheliale cellen, macrofagen, Langerhanscellen, dendritische cellen en keratinocyten. S100 is bijgevolg weinig specifiek en een positieve reactie kan eveneens verkregen worden met onder andere tumoren van het perifere zenuwstelsel, gastro-intestinaal stelsel, kraakbeen en de speekselklier (Bahrami *et al.*, 2008; Salama *et al.*, 2008; Viott *et al.*, 2007). Melan-A (syn. MART-1) is een antigen van melanocyten en wordt daarom als supplementaire merker gebruikt om melanoma's te diagnosticeren (Figuur 4). Deze merker is evenwel weinig gevoelig, maar specifieker dan S100.

#### Merkers voor hematopoëtische origine

De "leukocyte common antigen" CD45 wordt in de humane pathologie gebruikt als hoogspecifieke en sensitieve merker voor lymfoïde tumoren (Bahrami *et al.*, 2008). In de diergeneeskunde gebruikt men echter een panel van 3 of 4 merkers om histiocyten (CD18 of MHCII), T-lymfocyten (CD3) en B-lymfocyten (CD79a) aan te tonen (Figuur 5) (Fernandez *et al.*, 2005). Naast CD79a wordt CD45RA aangewend om tumoren van plasmacellen bij honden te identificeren (Schrenzel *et al.*, 1998).

#### PROGNOSE

Clinici gebruiken in hoofdzaak de TNM-classificatie om "staging" van een neoplastisch proces te doen en om aldus een idee omtrent het verloop ervan te verkrijgen. De pathologen vullen dit aan met het histologisch onderzoek van het gezwel. Hiertoe wordt niet enkel beoordeeld of het al dan niet een kwaadaardige tumor betreft. In veel gevallen bepaalt men een "grade" ("hooggradig" = meer kwaadaardig). Deze is vaak gebaseerd op het scoren van differentiatie, kernatypie, mitose-index, het invasief vermogen en tumorvrije randen op HE-gekleurde coupes. Het immunohistochemisch onderzoek draagt ook hier zijn steentje bij. Het proliferatieritme kan semikwantitatief worden beoordeeld door het aantonen van eiwitten die tijdens de mitose (kortstondig) tot expressie komen. Frequent gebruikte merkers zijn Ki67 (MIB-1) (Figuur 6) en proliferating cell nuclear antigen (Roels *et al.*, 1999). De detectie van producten van gemuteerde genen wordt eveneens vaak geassocieerd met een on-

gunstig verloop. Bij mastceltumoren werd aangetoond dat een verhoogde c-kitexpressie (Figuur 7) geassocieerd is met een lage overlevingsperiode (Webster *et al.*, 2007). Een verhoogde expressie van p53 wordt waargenomen bij hooggradige lymfomen (Suiero *et al.*, 2004). De graad van vascularisatie in een tumor kan worden bepaald door kleuringen tegenover CD31 en het factor VIII-gerelateerd antigeen. Bij sarcoma's van de weke weefsels werd dit geassocieerd met een verhoogd metastaserend vermogen (Luong *et al.*, 2006).

Voor elk type van tumor dient men afzonderlijke criteria op te stellen. Niet alle hogergenoemde kenmerken worden immers met elke tumor met een slechte prognose geassocieerd. Bovendien zijn er in de literatuur vaak tegenstrijdige resultaten betreffende het gebruik van eenzelfde merker binnen een zelfde tumortype. De resultaten en bijhorende interpretatie door de patholoog zijn dus niet absoluut en zijn louter richtinggevend.

Immunohistochemie wordt ook gebruikt om epitheliale lymfogene metastasen op te sporen. Bij melkkliertumoren bij de teef worden regelmatig de axillaire en/of inguinale lymfeknopen ingesloten voor histologisch onderzoek. Bij HE-kleuring van deze lymfeknopen wordt gezocht naar tumorale epitheliale cellen, doch deze kunnen niet altijd worden teruggevonden. Om de gevoeligheid te verhogen wordt immunohistochemie voor het aantonen van cytokeratine gebruikt (Figuur 8). Daarnaast wordt ze aangewend om de plaats van oorsprong van metastatische tumoren te bepalen.

## THERAPIE

Een correcte diagnose en identificatie van het neoplastisch proces zijn noodzakelijk om een accurate therapie te kunnen instellen. Zoals hoger vermeld, speelt het immunohistochemisch onderzoek hierbij een zeer belangrijke rol. Daarnaast wordt dit onderzoek ook

**Tabel 1. Immunohistochemische merkers voor tumorpathologie gebruikt aan het Laboratorium voor Pathologie van de Huisdieren van de UGent.**

Identificatie van de cel van oorsprong	
Cytokeratine	Epitheliale cellen
Vimentine	Mesenchymale cellen
Synaptophysine	Neuro-endocriene cellen, neuronen
Neuron-specifieke enolase	Neuro-endocriene cellen, neuronen
Glial fibrillary acidic antigen	Astrocyten
S100	Melanocyten
Melan A	Melanocyten
CD3	T-lymfocyten
CD79a	B-lymfocyten
CD20	B-lymfocyten
CD18	Macrofagen
Lysozym	Macrofagen
MHCII	Antigeenpresenterende cellen
CD45RA	Plasmacellen
CD31	Endotheelcellen
Von Willebrandfactor (factor VIII related antigen)	Endotheelcellen
Smooth muscle actine	Gladde spiercellen
Desmine	Gladde en dwarsgestreepte spiercellen
Thyroglobuline	Thyroid folliculaire cellen
Osteocalcine	Osteoblasten
Prognose	
Ki67 (MIB-1)	Proliferatieritme
Proliferating cell nuclear antigen	Proliferatieritme
C-kit	Graad 3 mastceltumoren
E-cadherine	Intercellulaire connecties
Collageen IV	Basale membraan
Laminine	Basale membraan
Oestrogenreceptor	Melkkliertumoren
Progesteronreceptor	Melkkliertumoren
Parathyroid related protein	Hypercalcemie
Caspase-3	Apoptose
Therapie	
P-glycoproteine	Resistentie chemotherapeutica
Cox-2	NSAID-gevoeligheid

aangewend om een therapie bij te sturen. Permeabiliteits glycoproteïne (P-gp) is een transmembranair eiwit dat een rol speelt in de secretie van diverse stoffen uit de cel (Van der Heyden *et al.*, 2008). De overexpressie van P-gp wordt bij humane tumoren geassocieerd met een resistentie tegenover meerdere chemotherapeutica, zoals doxorubicine, mitoxantrone, vinblastine, vincristine, colchicine, ethidium bromide (Germann, 1996). Bij verschillende tumoren bij de hond (Petterino *et al.*, 2006) en de kat (eigen bevindingen) (Figuur 9), kon eveneens een verhoogde P-gp-expressie worden waargenomen, doch weinig gegevens zijn bekend omtrent hun rol bij de resistentie tegen een therapie. In één studie werd aangetoond dat er een hoger risico is op het falen van een therapie bij honden met lymfoma's waarvan meer dan 50% van de cellen een P-gp-overexpressie bezat (Lee *et al.*, 1996).

Cox-2 is de induceerbare isovorm van het cyclooxygenase enzym. De overexpressie van dit enzym in neoplastische cellen leidt tot een verhoogde productie van prostaglandine E<sub>2</sub> en is geassocieerd met resistentie tegenover apoptose, versterkte angiogenese en gestegen delingsritme (Dempke *et al.*, 2001). Coxinhibitoren (zoals de niet-steroidale anti-inflammatoire drugs, NSAID's) kunnen dan ook worden aangewend als preventie en therapie tegenover kanker (Lupulescu, 1996). Bij de hond werd Cox-2-expressie bij verschillende typen van tumoren waargenomen (Mohammed *et al.*, 2004). Een gunstig effect van onder andere NSAID's, werd waargenomen bij de behandeling van caniene orale squameuscel carcinoma's en overgangscelcarcinoma's van de blaas (Schmidt *et al.*, 2001; Mohammed *et al.*, 2002).

## BESLUIT

Immunohistochemie is onmisbaar geworden in de diagnostiek van neoplastische processen. Er bestaat evenwel geen algemeen protocol voor het gebruik van merkers waarmee een tumor nader gekarakteriseerd kan worden. De patholoog maakt dan, vaak in samenspraak met de practicus, een keuze betreffende welke merkers er zullen worden gebruikt, in aansluiting op het histologisch routineonderzoek. Aan het Laboratorium voor Pathologie van de Huisdieren van de UGent is een groot aantal immunohistochemische merkers beschikbaar voor de geavanceerde tumordiagnostiek, tumorprognose en de follow-up van tumor(chemo)therapie (Tabel 1.)

## REFERENTIES

Ahern T.E., Bird R.C., Bird A.E.C., Wolfe L.G. (1993). Overexpression of c-erbB-2 and c-MYC but not c-RAS, in canine melanoma cell-lines, is associated with metastatic potential in nude mice. *Anticancer Research* 13, 1365-1371.

Bahrami A., Truong L.D., Ro J.y. (2008). Undifferentiated tumor: True identity by immunohistochemistry. *Archives of Pathology and Medicine* 132, 326-348.

Barthez P.Y., Marks S.L., Woo J., Feldman E.C., Matteucci M. (1997). Pheochromocytoma in dogs: 61 cases (1984-1995). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11, 272-278.

Brower A., Herold L.V., Kirby B.M. (2006). Canine cardiac mesothelioma with granular cell morphology. *Veterinary Pathology* 43, 384-387.

Brown P.J., Rema A., Gartner F. (2003). Immunohistochemical characteristics of canine aortic and carotid body tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 50, 140-144.

Coons A.H., Creech H.J., Jones R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. In: *Proceedings of the Society of Experimental Biological Medicine* 47, 200.

da Cunha N.P., Ghisleni G., Romussi S., Caniatti M. (2007). Prostatic sarcomatoid carcinoma in a dog: cytologic and immunohistochemical findings. *Veterinary Clinical Pathology* 36, 368-372.

Dempke W., Rie C., Grothey A., Schmoll H.J. (2001). Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 127, 411-417.

Ducatelle R., Broekaert D., Coucke P., Gillis E., Hoorens J. (1985). Immunoperoxidase kleuringen voor tumor diagnose en de toepassing in de diergeneeskunde. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 54, 187-207.

Dutra A.P., Granja N.V.M., Schmitt F.C., Cassali G.D. (2004). c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37, 1673-1681.

Eyden B., Pandit D., Banerjee S.S. (2005). Malignant melanoma with neuroendocrine differentiation: clinical, histological, immunohistochemical and ultrastructural features of three cases. *Histopathology* 47, 402-409.

Fernandez N.J., West K.H., Jackson M.L., Kidney B.A. (2005). Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Veterinary Pathology* 42, 437-445.

Forrest L.J., Galbreath E.J., Dubielzig R.R., MacEwen E.G. (1997). Peripheral neuroblastoma in a dog. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 38, 457-460.

Germann U.A. (1996). P-glycoprotein – a mediator of multidrug resistance in tumor cells. *European Journal of Cancer* 32A, 927-944.

Keller S.M., Schade B., Rickenbacher A.B., Brugnera E., Wergin M.C., Muller E.J. Suter M.M., Guscetti F. (2007). A comprehensive test system to identify suitable antibodies against p53 for immunohistochemical analysis of canine tissues. *Journal of Comparative Pathology* 137, 59-70.

Koenig A., Bianco S.R., Fosmire S., Wojcieszyn J., Modiano J.F. (2002). Expression and significance of p53, Rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary Pathology* 39, 458-472.

Kumar V., Abbas A., Fausto N. (2005). Robbins and Cotran pathologic basic of disease. Chapter 7. *Neoplasia*, 269-342.

Lee J.J., Hughes C.S., Fine R.L., Page R.L. (1996). P-glycoprotein expression in canine lymphoma - A relevant, intermediate model of multidrug resistance. *Cancer* 77, 1892-1898.

Levine R.A. (2002). Overexpression of the *sis* oncogene in a canine osteosarcoma cell line. *Veterinary Pathology* 39, 411-412.

Luong R.H., Baer K.E., Craft D.M., Ettinger S.N., Scase

- T.J., Bergman P.J. (2006). Prognostic significance of intratumoral microvessel density in canine soft-tissue sarcomas. *Veterinary Pathology* 43, 622-631.
- Lupulescu A., (1996). Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandines Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 54, 83-94.
- Mohammed S.I., Bennett P.F., Craig B.A., Glickman N.W., Mutsaers A.J., Snyder P.W., Widmer W.R., DeGortari A.E., Bonney P.L., Knapp D.W. (2002). Effects of the cyclooxygenase inhibitor, piroxicam, on tumor response, apoptosis, and angiogenesis in a canine model of human invasive urinary bladder cancer. *Cancer Research* 62, 356-358.
- Mohammed S.I., Khan K.N.M., Sellers R.S., Hayek M.G., DeNicola D.B., Wu L., Bonney P.L., Knapp D.W. (2004). Expression of cyclooxygenase-1 and 2 in naturally-occurring canine cancer. *Prostaglandines Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 70, 479-483.
- Montoliu P., Anor S., Vidal E., Pumarola M. (2007). Histological and immunohistochemical study of 30 cases of canine meningioma. *Journal of Comparative Pathology* 135, 200-207.
- Nasir L. (2008). Telomeres and telomerase: Biological and clinical importance in dogs. *The Veterinary Journal* 175, 155-163.
- Ozaki K., Yamagami T., Nomura K., Narama I. (2007) Prognostic significance of surgical margin, Ki-67 and cyclin D1 protein expression in grade II canine cutaneous mast cell tumor. *Journal of Veterinary Medical Science* 69, 1117-1121.
- Petterino C., Rossetti E., Bertinello D., Martini M., Zappulli V., Bargelloni L., Castagnaro M. (2006). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (Clone C494) in canine mammary gland tumours. *Journal of Veterinary Medicine A* 53, 174-178.
- Restucci B., Maiolino P., Martano M., Esposito G., De Filippis D., Borzacchiello G., Lo Muzio L. (2007). Expression of beta-catenin, E-cadherin and APC in canine mammary tumors. *Anticancer Research* 27, 3083-3089.
- Roels S., Tilmant K., Ducatelle R. (1999). PCNA and Ki67 proliferation markers as criteria for prediction of clinical behaviour of melanocytic tumours in cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology* 121, 13-24.
- Salama I., Malone P.S., Mihaimed F., Jones J.L. (2008). A review of the S100 proteins in cancer. *European Journal of Surgical Oncology* 34, 357-364.
- Sano J., Oguma K., Kano R., Hasegawa A. (2003). Canine Bcl-xL gene and its expression in tumor cell lines. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 149-151.
- Schrenzel M.D., Naydan D.K., Moore P.F. (1998). Leukocyte differentiation antigens in canine cutaneous and oral plasmacytomas. *Veterinary Dermatology* 9, 33-41.
- Schmidt BR, Glickman NW, DeNicola DB, de Gortari AE, Knapp DW (2001). Evaluation of piroxicam for the treatment of oral squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 218, 1783-1786.
- Shay J.W., Bacchetti S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer* 33, 787-791.
- Smith S. H., Goldschmidt M.H., McManus P.M. (2002). A Comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology* 39, 651-678.
- Sueiro F.A.R., Alessi A.C., Vassallo J. (2004). Canine lymphomas: a morphological and immunohistochemical study of 55 cases, with observations of p53 immunopositivity. *Journal of Comparative Pathology* 131, 207-213.
- Van der Heyden S., Chiers K., Ducatelle R. (2007). De rol van P-glycoproteïne en andere ABC-transporters in fysiologische en pathologische processen. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 76, 177-185.
- Viott A.M., Ramos, A.T., Inkelmann M.A., Kommers G.D., Graca, D.L. (2007). Histochemical and immunohistochemical features of peripheral nerve neoplasms. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia* 59, 1145-1153.
- Webster, J. D., Yuzbasiyan-Gurkan V., Miller R.A., Kaneene J.B., Kiupel M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: Associations with c-KIT and its role in prognostication. *Veterinary Pathology* 44, 298-308.

## Dé adressengids voor de paardensportwereld.

**GRATIS 1 adresvermelding in 1 rubriek naar keuze**

Stuur vandaag nog uw coördinaten via: e-mail:  
info@media-service.be - Fax: +32 (0)16 28 63 39

Advertentiemogelijkheden worden op verzoek  
vrijblijvend verstuurd

