

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO



**EXPRESIÓN DE MARCADORES ASOCIADOS A
PROLIFERACIÓN Y ANGIOGÉNESIS EN CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE PERRO (*Canis lupus familiaris*)
DE DISTINTAS LOCALIZACIONES ANATÓMICAS.**

CRISTIAN ANDRÉS ERAZO SEPÚLVEDA

Memoria para optar al título profesional de
Médico Veterinario y al grado académico de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias
(Mención Patología).
Departamento de Patología Animal

PROFESOR GUIA: FEDERICO CIFUENTES RAMOS
Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y
Pecuarias, Departamento de Patología Animal

SANTIAGO - CHILE
2019

Resumen

El carcinoma de células escamosas (CCE) canino está entre las neoplasias malignas más frecuentes en la piel (CCE-P), los dedos (CCE-D) y la cavidad oral (CCE-O). El CCE-P tanto patológico como clínicamente se considera menos agresivo y de mejor pronóstico que los CCE-D y los CCE-O. En el presente estudio con el fin de encontrar una respuesta biológica a lo anterior, se realizó un perfil de expresión de moléculas asociadas a proliferación, mediante el índice proliferativo (IP) y expresión de receptores tirosina quinasa (RTK); y asociadas a angiogénesis, mediante la densidad microvascular (MVD). Para estos perfiles se utilizaron los marcadores Ki-67 (IP), EGFR (RTK), VEGFR-2 (RTK) y CD31 (MVD) mediante inmunohistoquímica (IHQ) en CCE-P (n=20), CCE-D (n=9) y CCE-O (n=10) caninos, fijados en formalina y embebidos en parafina. Las tres localizaciones anatómicas de CCE canino presentaron expresiones IHQ estadísticamente similares para IP (P=0,79), expresión de EGFR (P=0,57), expresión de VEGFR-2 (P=0,47) y MVD (P=0,20). Estos resultados sugieren que las diferencias en agresividad y pronóstico entre las distintas localizaciones de CCE canino, no serían explicados por los niveles de proliferación y angiogénesis.

Palabras claves: Canino, Carcinoma de células escamosas, Piel, Dedos, Oral, Inmunohistoquímica, Índice proliferativo, Receptores tirosina quinasa, EGFR, VEGFR-2, Densidad microvascular.

Abstract

Squamous cell carcinoma (CCE) is among the most frequent malignancies in the skin (CCE-P), digital (CCE-D) and oral cavity (CCE-O). CCE-P is pathologically and clinically less aggressive and better prognostic than CCE-D and CCE-O. In the present study, in order to find a biological answer to former statement, a proliferation and angiogenesis associated molecules expression profile was made; in the first by proliferative index (IP) and expression of tyrosine kinase receptors (RTK) and second by microvessel density (MVD). For these profiles, we assessed immunohistochemistry (IHQ) markers for Ki-67 (IP), EGFR (RTK), VEGFR-2 (RTK) and CD31 (MVD) in canine formalin fixed and paraffin embedded CCE-P (n = 20), CCE-D (n = 9) and CCE-O (n = 10). The IHQ expressions of the three anatomical locations of canine CCE were statistically similar for IP (P = 0.79), EGFR (P = 0.57), VEGFR-2 (P = 0.47) and MVD (P = 0.20). These results suggest that the differences in aggressiveness and prognosis between the different locations of canine CCE, would not be explained by the levels of proliferation and angiogenesis.

Key words: Canine, Squamous cell carcinoma, Skin, Digital, Oral, Immunohistochemistry, Proliferative index, Tyrosine kinase receptors, EGFR, VEGFR-2, Microvessel density.

1. INTRODUCCIÓN

El carcinoma de células escamosas (CCE) es una neoplasia maligna de origen epitelial, que ocurre en distintas localizaciones anatómicas relacionadas con la piel y mucosas. Esta es una de las neoplasias malignas más frecuentes en perros.

No se han determinado parámetros pronósticos bien definidos en CCE de perros. Aunque se han propuesto grados histológicos, estos tienen poca relación con el pronóstico del paciente. Por otra parte, algunas localizaciones anatómicas como la cavidad oral y los dedos se han asociado a un mal pronóstico en relación con el CCE del resto de la piel. Sin embargo, hay escasa información científica que sustente el origen de esta diferencia.

Se ha descrito que algunos marcadores moleculares tienen aumentada su expresión en el CCE en humanos. Estos están asociados a proliferación celular como: Ki-67 y Receptores Tirosina Quinasa (RTKs, por su acrónimo en inglés) y otros asociados a angiogénesis como: CD31. En humanos, se utilizan perfiles de expresión de moléculas asociadas a proliferación y angiogénesis, en diversas neoplasias malignas como los carcinomas de esófago, estómago, colorrectal, vejiga urinaria y la glándula mamaria. Estos perfiles han sido útiles para diferenciar niveles de agresividad neoplásica y/o estimar su pronóstico. La proliferación celular y la angiogénesis están estrechamente relacionados con el proceso oncogénico y la malignidad de una neoplasia, entonces un perfil de marcadores moleculares asociados a estos procesos puede ser útil como discriminador del nivel de agresividad entre diferentes neoplasias.

Este trabajo pretende determinar si existen diferencias en relación con la proliferación celular (Expresión de Ki-67, EGFR y VEGFR-2) y la angiogénesis (Expresión de CD31), entre los CCE de perro proveniente de la piel, los dedos y la cavidad oral.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EPIDEMIOLOGÍA

En perros, el carcinoma de células escamosas (CCE) es una de las neoplasias malignas más frecuentes (Gross *et al.*, 2005; North y Banks, 2009; Withrow *et al.*, 2013). En la piel es la segunda más frecuentes después del mastocitoma (Withrow *et al.*, 2013). En el dedo es la más frecuente (Gross *et al.*, 2005) y en la cavidad oral es la segunda más frecuente, siendo solo superada por el melanoma (North y Banks, 2009).

Los CCE de piel (CCE-P) en perros se presentan principalmente entre los 10 a 11 años de edad, con mayor frecuencia en las áreas desprovistas de pelaje y poco pigmentadas como el abdomen y la cara medial de los miembros. Algunos autores consideran de alto riesgo a razas con piel clara como: Gran Danés Arlequín, Pitbull Terrier, Dálmata y Beagle (Gross *et al.*, 2005). Esto relacionado a la posible influencia de los rayos UV en su patogenia (Nikula *et al.*, 1992; Wei *et al.*, 2015). Sin embargo, también se ha presentado con alta frecuencia en razas de piel oscura como: Bloodhound, Bassett Hound, Poodle Negro, Labrador y Golden Retriever Negro (Withrow *et al.*, 2013).

En los dedos, el CCE digital (CCE-D) se presenta a una edad promedio de 10,2 años (rango entre 4-16 años). Es más frecuente en razas grandes (75%), razas de piel oscura (94%) y en las extremidades torácicas (60%) en comparación con las pélvicas (40%) (Belluco *et al.*, 2013; Henry *et al.*, 2005). Este tumor en el perro debido a su comportamiento biológico más agresivo y un peor pronóstico tiene una importancia patológica y clínica diferente al CCE-P.

Los CCE orales (CCE-O) en perros se presentan principalmente entre los 8-10 años e infrecuentemente han sido reportados en perros de 2-5 meses de edad (North y Banks, 2009; Withrow *et al.*, 2013). Estos tienen una mayor frecuencia en razas como: Poodle, Labrador Retriever, Samoyedo, English Springer Spaniel y Shetland Sheepdog (Nemec *et al.*, 2012; Withrow *et al.*, 2013). Las localizaciones más comunes son la gingiva de los dientes incisivos, de los premolares de la mandíbula, de los molares de la maxila, la mucosa de la lengua y tonsilas. Los CCE de tonsila presentan un comportamiento particularmente agresivo

y mayor potencial de metástasis, por esto algunos investigadores los consideran un subgrupo de los CCE-O (North y Banks, 2009).

2.2 BIOLOGÍA DEL CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

2.2.1. Biología del cáncer.

El desarrollo de una neoplasia resulta de modificaciones genéticas y epigenéticas ocurridas en las células a lo largo del tiempo, que pueden llevar a la formación de células con características neoplásicas, en un proceso conocido como transformación neoplásica (Meuten, 2017). Debido a la acumulación de estas modificaciones y a la proliferación descontrolada resultante, se llega a la formación de un tumor o masa. Durante esta transformación hay tres etapas importantes: iniciación, promoción y progresión (Zachary, 2017). Debido al avance del conocimiento sobre el microambiente tumoral, se propone que este microambiente está contribuyendo y permitiendo constantemente la transformación neoplásica, modificándose a medida que avanza la transformación neoplásica (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha propuesto que una respuesta inmune leve contra las células neoplásicas benignas estimularía a estas a proliferar y adquirir un fenotipo más agresivo (Prehn y Prehn, 2013). Se propone que esta estimulación antigénica sería inducida contra nuevos antígenos, propios de las células neoplásicas, que se generan en la etapa de neoplasia benigna (Prehn y Prehn, 2013).

La iniciación es la primera de las etapas en la transformación neoplásica y comprende la introducción de cambios genéticos irreversibles en las células. Estos cambios pueden ser producidos por carcinógenos físicos, químicos y/o biológicos que provocan mutaciones en uno o más genes. Si se conservan estas modificaciones, serán traspasadas a la progenie celular (Zachary, 2017). Estas células iniciadas pueden permanecer en quiescencia por un tiempo indefinido, hasta que ocurran nuevos cambios que favorezcan su proliferación. Se ha propuesto que los factores iniciadores también afectan a las células estromales y otras

provenientes de la médula ósea, estimulándolas a generar un nicho pre cancerígeno (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

La promoción es la segunda etapa en la transformación neoplásica y comprende el crecimiento de las células ya iniciadas gracias a un estímulo selectivo llamado agente promotor. Los agentes promotores otorgan ventajas para las células iniciadas a diferencia de las no iniciadas, creando un ambiente favorable para la proliferación de las primeras. Estos agentes no producen mutaciones y por lo tanto su efecto puede ser reversible. En esta etapa se generan las neoplasias benignas (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013; Zachary, 2017). Otro elemento que ayuda a que las células iniciadas proliferen es el nicho pre cancerígeno, el cual también puede estimular la migración de otras células a este nicho. Esta migración promueve la reprogramación del estroma residente, favoreciendo el desarrollo neoplásico (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

La progresión es la tercera etapa y la más compleja en la transformación neoplásica, porque involucra que las células neoplásicas adquieran habilidades para la sobrevivencia e invasividad. Hay dos características distintivas de la progresión, una es la inestabilidad genómica y la otra es el incremento en la heterogeneidad celular. En la progresión puede ocurrir el cambio de una neoplasia benigna a una maligna, que es capaz de invadir y realizar metástasis (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013; Zachary, 2017). Se ha propuesto que durante la progresión las células estromales estimularían la proliferación, invasión de las células neoplásicas y la supresión del sistema inmune (Barcellos-Hoff *et al.*, 2013).

Existen varios mecanismos para favorecer el desarrollo neoplásico y están resumidos en los sellos del cáncer o *hallmarks of cancer* (Hanahan y Weinberg, 2011). Estas características surgen a partir de la inestabilidad genómica y la promoción de la inflamación, siendo adquiridas por las células en su tránsito a ser neoplásicas y les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse. Los sellos del cáncer son: 1) señalización sostenida de la proliferación 2) evasión de los supresores del crecimiento 3) activación de la invasión y metástasis 4) activación de la inmortalidad replicativa 5) inducción de la angiogénesis y 6) resistencia a la muerte celular. Los primeros dos sellos están estrechamente relacionados y tienen como resultado el aumento de la capacidad proliferativa, y el quinto, refleja la capacidad que poseen las neoplasias para promover la angiogénesis, con el propósito de aumentar la

sobrevivencia, proliferación y facilitar la metástasis (Hanahan y Weinberg, 2011). Los conceptos de proliferación y angiogénesis serán el foco de este proyecto y serán revisados más adelante.

El desarrollo de un tumor depende no solo de las células neoplásicas, sino también de las relaciones que se establecen entre estas y su ambiente, el que en muchas ocasiones determina el destino de la neoplasia (Quail y Joyce, 2013; Whiteside 2008).

Las neoplasias están inmersas en un microambiente tumoral (MAT) compuesto por las mismas células neoplásicas, fibroblastos y matriz extracelular, tejido adiposo, vasos sanguíneos peritumorales, células inflamatorias y/o inmunes que infiltran el tumor, entre otras células. Estos componentes son característicos de cada neoplasia y le entregan propiedades que ayudan a la transformación neoplásica. Por lo tanto, la malignidad de una neoplasia no solo depende de las características propias de las células neoplásicas, sino también de los beneficios que les puede entregar el MAT, favoreciendo la nutrición, evasión de la respuesta inmune, invasión tisular y metástasis (Whiteside, 2008).

Las células estromales (principalmente fibroblastos) son reprogramadas o incluso se ha postulado que son fibroblastos distintos de los residentes y tendrían un origen endotelial (Seizberg *et al.*, 2007). Estos fibroblastos asociados a cáncer (CAF por su acrónimo en inglés) estimulan a las células neoplásicas a través de una comunicación paracrina para que desarrollen un fenotipo más invasivo. Para lograr esto, los CAF estimulados por las células neoplásicas modifican el tejido conectivo facilitando la motilidad e invasividad de las células neoplásicas (Quail y Joyce, 2013).

Los vasos sanguíneos peritumorales son uno de los componentes más estudiados en las neoplasias y tienen una estrecha relación con la progresión de una neoplasia. El aumento de estos ha sido relacionado con malignidad y pronóstico neoplásico, siendo una de las vías más estudiadas para para determinar diferencias en el comportamiento biológico de las neoplasias (Quail y Joyce, 2013).

Las células inflamatorias e inmunes son un componente importante en la progresión neoplásica. En los inicios de la investigación en cáncer se había postulado que la infiltración de células inmunes en el tejido peritumoral, inhibiría el crecimiento de este tumor. Sin

embargo, se ha demostrado que estas células inmunes son inducidas por las células neoplásicas a secretar moléculas que promueven la proliferación celular, angiogénesis y la evasión de la respuesta inmune, entre otras funciones (Prehn y Prehn, 2013; Whiteside, 2008). La naturaleza e intensidad de los infiltrados inflamatorios en el microambiente se va modificando a medida que el tumor se desarrolla (Whiteside, 2008). Las células del sistema inmune más estudiadas y relacionadas con oncogénesis son los linfocitos T reguladores (linfocitos Treg), macrófagos con funciones pro-tumorales (fenotipo M2) y un subtipo de células dendríticas inmaduras, denominadas células supresoras derivadas mieloides (MDSC, por su acrónimo en inglés) (Whiteside, 2008; Quail y Joyce, 2013).

La invasión es un proceso que caracteriza a las neoplasias malignas y las diferencia de aquellas benignas (Zachary, 2017). Esta capacidad invasiva es un paso intermedio y necesario para la metástasis (Zachary, 2017). La invasión local y la metástasis tienen algunos elementos comunes, que no poseen las de las células del tumor no invasivo y del tejido de origen, como la eliminación de las uniones entre las células neoplásicas, modificaciones en las interacciones con las células estromales y la matriz extracelular, adquisición de motilidad e invasión tisular (Meuten, 2017; Zachary, 2017). En este proceso la célula adquiere características que son similares a las células mesenquimales. Por lo tanto, a este proceso en las neoplasias epiteliales se le denomina plasticidad celular y está estrechamente relacionado con el concepto de transición epitelio mesénquima (TEM) (Brabletz *et al.*, 2018). Las células neoplásicas que adquieren este fenotipo mesenquimal también pueden secretar proteasas que ejercen una actividad importante en la degradación de la matriz extracelular, promoviendo la invasión (Lamouille *et al.*, 2014).

La TEM es un programa ejecutado por la activación de factores de transcripción. Estos factores de transcripción tienen diversas funciones en la iniciación de un tumor, crecimiento del tumor primario, invasión, diseminación, metástasis y hasta resistencia a las terapias (Brabletz *et al.*, 2018; Nieto *et al.*, 2016; Lamouille *et al.*, 2014). Asimismo, algunas señalizaciones activadas por los factores de transcripción de TEM estimulan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias e inmunosupresoras en las células neoplásicas, lo que contribuye a un MAT favorable para el desarrollo neoplásico (Brabletz *et al.*, 2018).

Las células neoplásicas después de invadir el sitio primario pueden crecer en un sitio secundario, fenómeno denominado metástasis. Esta se puede llevar a cabo atravesando la membrana basal de las células endoteliales del sitio primario, pasando al torrente sanguíneo o a las vías linfáticas y desde allí lograr adherirse en el endotelio del nicho de metástasis (secundario), ingresar, alojarse y crecer en este sitio (Meuten, 2017). Este proceso no solo es logrado por las características invasivas de las células neoplásicas, sino también por la permisividad del microambiente del nicho secundario y su estrecha comunicación celular (Quail y Joyce, 2013).

2.2.2. Etiología del carcinoma de células escamosas

En humanos con CCE cutáneo se ha demostrado que la radiación UV es responsable del desarrollo de esta neoplasia (Wei *et al.*, 2015). En el CCE oral en humanos, las etiologías dominantes están relacionadas con la ingesta de tabaco y alcohol (Feller *et al.*, 2013). Por otro lado, algunos papillomavirus humanos han sido involucrados como agentes causales de diversos cánceres como el CCE cérvico uterino, de orofaringe, entre otros (Fischer *et al.*, 2017).

En perros con CCE cutáneo se atribuye principalmente a la radiación UV como etiología predisponente (Nikula *et al.*, 1992; Zachary, 2017). En el caso del CCE oral canino se sugiere que podría ocurrir por la infección de algún papilomavirus canino (Munday *et al.*, 2016). La etiología del CCE digital canino se desconoce, pero se ha propuesto que el estrés mecánico y la inflamación secundaria a este, podrían estar asociados (Henry *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que la radiación UV es capaz de dañar e inducir cambios genéticos, epigenéticos y en la transcripción en las células (Shen *et al.*, 2017). Las mutaciones más comunes provocadas por la radiación UV en los queratinocitos y relacionadas con CCE en humanos y otros animales, ocurren principalmente en genes supresores de tumores como TP53, CDKN2A, NOTCH1, AJUBA, HRAS, entre otros (Pickering *et al.*, 2014). La proteína p53 es una de las proteínas más estudiadas en CCE, ya que frente a daños en el ADN es capaz de inducir arresto celular de manera irreversible o en su defecto inducir en estas apoptosis. Debido a lo anterior, una disfunción de p53 puede llevar a un estado de proliferación

descontrolado (Kruiswijk *et al.*, 2015). Adicionalmente, algunos estudios muestran que en CCE hay una disminución de la expresión de p27, una proteína asociada con inhibición del ciclo celular bajo condiciones de proliferación descontrolada (Bencivenga *et al.*, 2017). Asimismo, en perros y gatos con CCE se ha descrito un aumento en la expresión de la proteína Ciclina A (Withrow *et al.*, 2013), la cual contribuye en la síntesis de ADN durante la fase S del ciclo celular (Mateo *et al.*, 2009).

Los papillomavirus humanos poseen proteínas que tienen efectos negativos sobre algunas proteínas celulares. Por ejemplo, la proteína E6 viral desestabiliza y promueve la degradación de p53 (Venuti *et al.*, 2011). Asimismo, la proteína E7 viral se une a la proteína retinoblastoma (pRb) celular, mediando su degradación y capacidad para inhibir el ciclo celular (Fischer *et al.*, 2017). Ambas proteínas están presentes en algunos tipos de virus papiloma canino (CPV) como CPV-2, CPV-7, CPV12, CPV-16 y CPV-17 (Goldschmidt *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2009; Munday *et al.*, 2016; Luff *et al.*, 2016). En perros con CCE de piel y oral se han identificado distintos tipos de virus de papiloma canino, aunque aún se discute su rol etiológico, debido a la baja frecuencia de casos positivos (Goldschmidt *et al.*, 2006; Lange *et al.*, 2009; Munday *et al.*, 2016; Luff *et al.*, 2016).

2.2.3. Origen histológico y características biológicas del CCE en perros

El origen histológico del CCE es el epitelio de la piel o mucosas (queratinocitos). En las células basales de este epitelio es donde ocurren las alteraciones genéticas que favorecen la transformación neoplásica y se amplifican en el estrato espinoso (Meuten, 2017). A medida que avanza la transformación neoplásica, la atipia se puede observar desde el estrato espinoso hasta los estratos más superficiales y llegar a transformarse en un carcinoma *in situ*. Independiente de su etiología, cuando las células neoplásicas atraviesan la membrana basal e invade la dermis, se denomina CCE (Gross *et al.*, 2005).

El CCE invade tanto superficial como profundamente la dermis o la submucosa. Además, puede invadir vasos linfáticos, tejido perineural y tejido óseo subyacente. La invasión a este último tejido podría ser una de las explicaciones al mal pronóstico asociado a algunas localizaciones anatómicas como los dedos y la cavidad oral (Withrow *et al.*, 2013 y Henry *et*

al, 2005). Cuando ocurre metástasis, las células neoplásicas migran a linfonodos locales o regionales, para luego hacer metástasis a tejidos más distantes (Gross *et al.*, 2005).

Los CCE de la piel (CCE-P) invaden localmente hacia la dermis y tejidos cercanos. En la literatura no hay datos concretos sobre la tasa de metástasis, pero se considera que las metástasis a linfonodos regionales son inusuales y la pulmonar es rara. Por lo tanto, cuando estas neoplasias son extirpadas quirúrgicamente, los perros tienen un buen pronóstico (Henry y Higginbotham, 2010).

Alrededor de un 80% de los perros con CCE digital (CCE-D) presentan lisis ósea de la tercera falange (Withrow *et al.*, 2013 y Henry *et al.*, 2005). Con relación a la metástasis, algunos autores coinciden que entre un 8 a 9% de los perros con CCE-D, la presentan al momento del diagnóstico (Withrow *et al.*, 2013 y Belluco *et al.*, 2013), en cambio otros autores han reportado un 15% de metástasis (Henry *et al.*, 2005). Cuando se compara el CCE-D de distintas zonas, existen diferencias en la sobrevivencia de los perros. Por ejemplo, aquellos perros con CCE-D de la zona subungueal tienen una tasa de sobrevivencia (TS) de un 95% al año y 74% a los 2 años desde el diagnóstico, en cambio los perros con CCE-D en otra zona del dedo tienen un peor pronóstico, con una TS de un 60% al año y de 40% a los dos años (Withrow *et al.*, 2013).

Aproximadamente un 77% de los perros con CCE oral (CCE-O) presentan lisis ósea, situación similar a la descrita para CCE-D (North y Banks, 2009). Los perros con CCE-O no tonsilares presentan alrededor de un 10% de metástasis a linfonodos regionales y un 20% a lugares distantes. No obstante, como se discutió previamente se ha observado que un 73% de los perros con CCE-O de tonsila presentan metástasis distantes (Withrow *et al.*, 2013). Debido a esto, diversos autores consideran al CCE tonsilar como un subtipo de CCE oral. En los CCE-O no tonsilares la TS al año después de la intervención quirúrgica es de 57% a un 91%. Particularmente, en los perros con CCE-O de lengua se utilizan como factores pronósticos la localización anatómica en la lengua y la graduación histológica (North y Banks, 2009).

La graduación histológica ha demostrado tener escaso valor pronóstico, excepto en CCE de la lengua. Así, los perros con CCE-O linguales que tienen un grado histológico más

diferenciado (grado I) alcanzan una mediana de supervivencia (MS) post quirúrgica de 16 meses, en contraste con perros con CCE-O lingual con grados histológicos menos diferenciados (grados II y III), que tienen una MS de 4 y 3 meses respectivamente (Carpenter *et al.*, 1993).

2.3 FACTORES ASOCIADOS A MALIGNIDAD EN CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

Los factores asociados a malignidad están relacionados con marcadores moleculares y en diversas neoplasias se han asociado con pronóstico y/o elección de una terapia específica. Por medio de estas moléculas, se pueden generar perfiles, que entregan más información sobre el comportamiento de una neoplasia. Por ejemplo, en humanos con CCE oral, adenocarcinoma y CCE de esófago, cáncer endometrial, entre otros, se ha utilizado como indicadores de mal pronóstico, la expresión de moléculas asociadas a potencial proliferativo como p53, Ki-67, EGFR, COX-2 y HER-2 (Søland y Brusevold, 2013; Binder y Mutch, 2014; Hong *et al.*, 2015). Por otro lado, también se utilizan marcadores asociados con potencial angiogénico en humanos con CCE de esófago y cáncer endometrial, en los que se ha utilizado la expresión de VEGF y la determinación de la densidad microvascular como indicadores de mal pronóstico (Binder y Mutch, 2014; Hong *et al.*, 2015). En perros también se utilizan algunos marcadores asociados a proliferación para determinar la agresividad del cáncer, pronóstico y la alternativa terapéutica adecuada. Por ejemplo, en mastocitoma cutáneo, se utiliza la combinación de Ki-67 y AgNOR, para detectar aquellos mastocitomas cutáneos de bajo grado con características más agresivas (Meuten, 2017).

Por lo tanto, para efecto de este estudio se pretende diseñar un perfil de malignidad que incluya la evaluación de la proliferación y angiogénesis, dado que están involucrados en procesos fundamentales para la oncogénesis.

2.3.1. Proliferación en el CCE

La proliferación es un proceso celular que permite mantener una cantidad de células estables dentro del tejido para su función normal. Este proceso está altamente regulado y depende de

factores promotores e inhibidores. Por otro lado, las células neoplásicas transitan permanentemente en el ciclo celular, generando un estado proliferativo constantemente activo. En este estado las células neoplásicas no se ven influenciadas por estímulos inhibitorios extrínsecos de proliferación, creciendo rápidamente si tienen los nutrientes suficientes (Zachary, 2017).

Tanto en humanos como perros, se ha utilizado el índice mitótico como un método para estimar el nivel de proliferación en las neoplasias (Meuten, 2017). Sin embargo, este es un parámetro poco sensible, ya que no evalúa a aquellas células que se encuentran en otras fases del ciclo celular que no sea la fase de mitosis. Por otro lado, existen marcadores nucleares del ciclo celular como Ki-67 y PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), los cuales son considerados mejores estimadores de proliferación en las neoplasias y pueden ser utilizados para establecer el grado de malignidad. En este contexto algunos autores consideran que Ki-67 es un estimador más específico de proliferación que PCNA, ya que tiene una menor vida media, por lo que no sería detectado en la fase G0. Asimismo, PCNA puede ser detectado durante la reparación del ADN (Zacchetti *et al.*, 2003). Es posible que ambos sean buenos indicadores del pronóstico (Massano *et al.*, 2006 y Al-Dissi *et al.*, 2007). Por ejemplo, en CCE-P se determinó que hay una alta correlación entre el índice de proliferación y el grado histológico (Al-Dissi *et al.*, 2007).

2.3.2. Receptores tirosina quinasa

Los receptores tirosina quinasa (RTK) son receptores de membrana celular altamente conservados entre los metazoarios y con gran importancia para la diferenciación, proliferación, migración y supervivencia celular (Rebay, 2003).

Uno de los elementos importantes en el desarrollo del cáncer es la activación aberrante de diversos receptores de factores de crecimiento. Estos receptores estimulan factores de transcripción, que a su vez regulan los procesos de proliferación, supervivencia, angiogénesis, entre otros, favoreciendo el desarrollo neoplásico (Zwick *et al.*, 2001). Por esto el aumento de la expresión de estos RTKs puede ser utilizado como un indicador pronóstico

o un indicador predictivo de una terapia. Además, el bloqueo de estos receptores puede ser utilizado como una herramienta terapéutica (Zwick *et al.*, 2001).

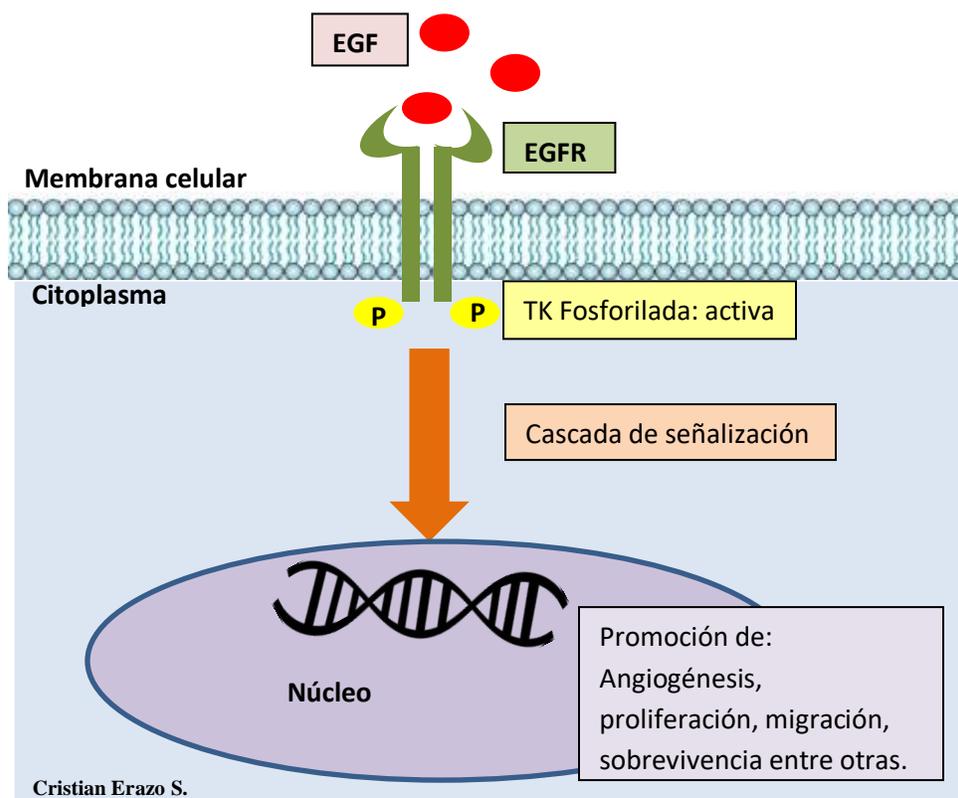
Existen diversos RTKs relacionados con oncogénesis y los más estudiados son los receptores de los factores de crecimiento epidermal (EGFR o HER-1), epidermal humano 2 (HER-2), vascular endotelial 1 (VEGFR-1 o Flt1), vascular endotelial 2 (VEGFR-2 o KDR), derivado de plaquetas (PDGFR), de fibroblastos (FGFR), entre otros (Zwick *et al.*, 2001). Se ha determinado una sobreexpresión de EGFR y HER-2 en distintas neoplasias epiteliales de humanos como CCE y carcinoma mamario (CM). Además, se describe que el receptor HER-2 puede actuar como un cofactor de EGFR, promoviendo la activación de este último (Zwick *et al.*, 2001). Se ha demostrado que estos marcadores son buenos estimadores de malignidad y pronóstico en distintas neoplasias en humanos, principalmente CM (Zwick *et al.*, 2001). Asimismo, existe una estrecha interacción entre VEGFR-1 y VEGFR-2, en la cual el primero promueve la migración de células endoteliales, pero no induce su proliferación. En cambio, VEGFR-2 es el mayor mediador de mitogénesis, proliferación y sobrevivencia de las células endoteliales (Mărgăritescu *et al.*, 2009). También se ha descrito que VEGFR-1 tiene un rol regulatorio sobre VEGFR-2 al competir por los mismos ligandos (Al-Dissi *et al.*, 2007). Por lo tanto, EGFR y VEGFR-2 pueden ser interesantes de estudiar como proteínas oncogénicas en CCE canino.

Los receptores de los factores de crecimiento epidermal (EGFR, por su acrónimo en inglés) y vascular endotelial tipo 2 (VEGFR-2, por su acrónimo en inglés) pertenecen a una gran familia de receptores tirosina quinasa (RTK, por su acrónimo en inglés), llamados así por su actividad enzimática. Todos estos receptores poseen una estructura similar con un dominio extracelular que se une al ligando, una hélice transmembrana simple y un dominio citosólico que contiene la actividad enzimática tirosina quinasa (TK, por su acrónimo en inglés) (Lemmon y Schlessinger, 2010).

En el caso de EGFR y VEGFR-2, la unión del ligando al dominio extracelular del receptor provoca la dimerización de los RTK, promoviendo su activación. Cuando el RTK está activo, se fosforilan sus sitios TK. Esto en el lado citosólico atrae y activa a proteínas que seguirán una cascada de señalización a través de un módulo de enzimas de señalización intracelular, conocidas como MAP-quinasas (por su acrónimo en inglés) (Lemmon y Schlessinger, 2010).

Este módulo enzimático estimula directamente la actividad de algunas proteínas como c-Jun y c-Fos (factores de transcripción), las que están relacionadas directamente con la proliferación. Además, se ha observado que los RTKs pueden estimular también a STAT1 y STAT3 (factores de transcripción), que están relacionados con el crecimiento celular (Lemmon y Schlessinger, 2010). En consecuencia, los RTKs estimulan esta cascada de señalización, favoreciendo la activación de distintos factores de transcripción, los que regulan la supervivencia, crecimiento, proliferación y angiogénesis, promoviendo el desarrollo neoplásico (Figura 1) (Lemmon y Schlessinger, 2010).

Figura 1. Esquema de señalización intracelular para EGFR.



EGF= Factor de crecimiento epidermal; **EGFR**= Receptor del factor de crecimiento epidermal; **TK**= Tirosina quinasa (Modificado de Lemmon y Schlessinger, 2010).

La sobreexpresión de RTKs ha sido demostrada en distintas neoplasias tanto en humanos como en perros, aunque en este último hay una menor cantidad de información que la relacione con sus efectos oncogénicos (Carvalho *et al.*, 2013 y Maiti *et al.*, 2013).

En humanos, la sobreexpresión de EGFR se ha observado en diversas neoplasias malignas como carcinoma de esófago, estómago, colorrectal, vejiga urinaria y glándula mamaria. Aún más, algunos de estos tumores se han asociado altos niveles de EGFR y un peor pronóstico (Alvarez *et al.*, 2006). Además, en humanos con CCE-O se determinó que la expresión de EGFR se incrementa a medida que aumenta la malignidad. El epitelio oral normal tiene una alta expresión de EGFR solo en las células basales y va decreciendo hacia las células suprabasales y estrato espinoso. A su vez, las lesiones pre-CCE tienen una alta expresión en células basales y suprabasales. Mientras que en el CCE la expresión de EGFR es alta en todos los estratos (Maiti *et al.*, 2013).

Por otra parte, en humanos con CCE-O se ha observado una sobreexpresión de distintos VEGFRs y se sugiere que estos participan directamente en la promoción de las células neoplásicas, angiogénesis e incluso metástasis (Mărgăritescu *et al.*, 2009). Asimismo, se ha asociado una mayor expresión de VEGFR con transformación o progresión neoplásica y se ha observado una expresión diferencial de VEGFR-1 y VEGFR-2, según el grado histológico. Además, una alta expresión de estos receptores ha sido asociada con metástasis a linfonodos regionales (Stîngă *et al.*, 2011).

En perros también se ha demostrado una mayor expresión de RTKs en neoplasias de distinto origen y localización, incluso algunos se asocian a distintos criterios de malignidad y/o pronóstico. Por ejemplo, en perras con CM se ha determinado que existe asociación entre la expresión de EGFR con el tamaño de la neoplasia, grado histológico y estadio clínico. Además, los CM con mayor expresión de EGFR, tienen mayor densidad microvascular (MVD) con una correlación positiva alta entre ambos factores (Carvalho *et al.*, 2013). Por otra parte, en perros con neoplasias del sistema nervioso central (SNC), se demostró que hay mayor expresión de EGFR en neoplasias de alto grado histológico como oligodendroglioma grado III, glioblastoma multiforme (astrocitoma grado III) y meningiomas grado II y III, en comparación a sus contrapartes de menor grado histológico (Dickinson *et al.*, 2006).

En perros con otras neoplasias se determinó una sobreexpresión de EGFR, pero no se relacionó esta expresión con parámetros de malignidad o pronóstico (Hanazono *et al.*, 2015; Sabattini *et al.*, 2014; Terragni *et al.*, 2014). Por ejemplo, en perros un 76% de las neoplasias primarias de pulmón fueron positivas a EGFR, siendo el tejido normal negativo. Sin embargo, no se encontró correlación entre la expresión de EGFR y tipo de neoplasia, grado histológico y actividad mitótica (Sabattini *et al.*, 2014). Asimismo, en perros con neoplasias epiteliales gástricas se ha determinado una sobreexpresión de EGFR en comparación a la mucosa gástrica normal, aunque no se ha determinado una correlación entre esta expresión y la estadificación, localización, tipo histológico o malignidad de la neoplasia (Terragni *et al.*, 2014). En perros con carcinoma de células transicionales se ha demostrado una sobreexpresión de EGFR en comparación al epitelio transicional normal y cistitis polipoide (utilizada como patrón de comparación), aunque no se ha determinado asociación entre esta expresión e invasión a vasos locales, metástasis a linfonodos y tiempo de sobrevida (Hanazono *et al.*, 2015).

En perros con CCE-P se ha demostrado la expresión de VEGFR-2 y se ha determinado que existe una relación directa entre este y VEGF y el índice proliferativo (Al-Dissi *et al.*, 2007). Por otro lado, en perros con CCE-D no se ha determinado la expresión de VEGFR-2, pero en CCE-D de alto grado histológico se ha descrito que hay mayor expresión de VEGF en comparación a otras localizaciones anatómicas (Maiolino *et al.*, 2000). Asimismo, en perros con CCE-O se ha determinado una correlación positiva entre VEGF y la graduación histológica, índice proliferativo y densidad microvascular; pero tampoco se ha determinado la expresión de VEGFR-2 (Martano *et al.*, 2016). Sin embargo, en otras neoplasias de perros se ha observado un aumento en la expresión de VEGFR-2. Por ejemplo, en perros con neoplasias del SNC se ha determinado que existe una mayor expresión de VEGFR-2 en meningiomas, astrogliomas y oligodendrogliomas, en comparación al tejido normal. Además, se determinó que la expresión de VEGFR-2 es significativamente mayor en neoplasias de alto grado histológico del SNC como oligodendrogliomas de grado III, glioblastoma multiforme (astrocitoma grado III) y meningiomas grado II y III (Dickinson *et al.*, 2006). Resultados similares se han observado en perros con mastocitoma cutáneo, en los que además se ha correlacionado la expresión de VEGFR-2 con el grado histológico, disminución de tiempo de sobrevida, disminución de intervalo libre de enfermedad,

disminución de la recurrencia local e incremento en la tasa de metástasis (Thompson *et al.*, 2015).

Por otra parte, en perras con CM se describió una expresión diferencial entre distintos componentes tisulares, donde el 89,6% de las células epiteliales del CM fueron positivas a VEGFR-2, en cambio el 48,3% del endotelio y el 44,8% del estroma fueron positivos a este receptor. Esta expresión fue contrastada con una expresión similar de VEGF, sugiriendo que en perras con CM existe una estimulación autocrina y paracrina (Millanta *et al.*, 2006). En perros con linfoma se demostró que existe expresión de VEGFR-2, aunque solo un 28% de los casos fueron positivos y no se determinaron parámetro de malignidad y/o pronóstico (Wolfesberger *et al.*, 2007).

2.3.3. Angiogénesis en el CCE

Las células neoplásicas pueden secretar factores angiogénicos o estimulan a que otras células cercanas sean capaces de secretar dichos factores. Estas células neoplásicas tienen mayor oportunidad de crecer, invadir y realizar metástasis. Por esta razón es importante la formación de nuevos vasos sanguíneos que permitan nutrir este tejido, proceso llamado angiogénesis (Zachary, 2017).

La angiogénesis es un proceso complejo que involucra el reclutamiento de células endoteliales desde vasos sanguíneos ya existentes, proliferación, migración de estas a través de la matriz extracelular, maduración y diferenciación a un brote capilar, a partir del cual se desarrollan más capilares. Estos son tortuosos en su distribución y más permeables que en otros tejidos. Además, los endotelios de estos vasos sanguíneos secretan factores de crecimiento que estimulan la proliferación de la neoplasia. Al mismo tiempo estos capilares permiten la migración de células neoplásicas a tejidos distantes (Zachary, 2017).

La hipoxia es uno de los factores desencadenantes de la angiogénesis y en el microambiente tumoral en general hay hipoxia por la alta demanda de oxígeno. Esta disminución en la tensión de oxígeno provoca que las células neoplásicas secreten VEGF-A, que estimula a las

células endoteliales cercanas mediante VEGFR-2, induciendo angiogénesis. Las células endoteliales se ven atraídas por el gradiente de concentración de VEGF-A y desorganizan sus uniones intercelulares, migrando hacia el tejido peritumoral. Este proceso también requiere la participación de dos moléculas señal, la angiopoyetina 2 que ayuda a la desorganización de las uniones celulares y la DLL-4 que ayuda a la motilidad de las células endoteliales (De Palma *et al.*, 2017).

En la hiperplasia, neoplasia benigna y carcinoma *in situ*, la lámina basal separa a las células premalignas de los vasos sanguíneos. En cambio, en las neoplasias malignas se genera una red de vasos sanguíneos robusta, que está en activo crecimiento e infiltración. A este proceso se le denomina cambio angiogénico (“*Angiogenic Switch*”). Sin embargo, se describe que existen diferentes patrones de vascularización tumoral que reflejan las diferencias del tipo celular, grado de diferenciación, estadificación de la neoplasia por un lado y por otro lado el sitio anatómico, la composición del estroma y el equilibrio entre la expresión de factores pro angiogénicos y anti angiogénicos. Estos distintos factores hacen a una neoplasia desde el punto de vista angiogénico, única (De Palma *et al.*, 2017).

En humanos algunos estudios han mostrado que la vascularidad se ve incrementada durante la progresión desde un epitelio normal a uno displásico y de este al carcinoma. Esto sugiere que el desarrollo de la neoplasia está acompañado de angiogénesis. No obstante, en humanos con CCE-O no se encontró dicha progresión de la vascularidad entre mucosa normal y epitelio displásico, pero si entre estos dos últimos y CCE-O, sugiriendo que el desarrollo de angiogénesis ocurriría posterior a la transformación neoplásica (Shivamallappa *et al.*, 2011).

La angiogénesis puede ser evaluada en los tejidos mediante la cuantificación de vasos sanguíneos pequeños, utilizando marcadores moleculares para endotelios, como el factor de von Willebrand o CD31. Esto se denomina densidad microvascular (MVD, por su acrónimo en inglés) (Meuten, 2017). Diversos estudios han descrito la medición de la MVD como estimador de angiogénesis en las neoplasias. Por lo tanto, se considera un estimador de malignidad y como un posible indicador pronóstico (Meuten, 2017).

En perros, CD31 fue probado por primera vez en tejidos normales y neoplasias vasculares, mostrando una mayor especificidad y sensibilidad que el factor de von Willebrand (Ferrer *et al.*, 1995). En CCE canino que incluyen la piel y los dedos, hay diferencia en los valores de MVD entre los grados histológicos más diferenciados y aquellos menos diferenciados (Maiolino *et al.*, 2001). Sin embargo, en otro estudio en perros con CCE-P no se encontraron diferencias significativas entre MVD y los distintos grados histológicos o los niveles de expresión de VEGFR-2; pero la mediana de MVD fue significativamente mayor en los CCE-P, en comparación a una neoplasia benigna como tricoepitelioma (Al-Dissi *et al.*, 2007).

3. HIPÓTESIS

En base a la evidencia disponible, los CCE de perro que se originan en la piel tienen mejor pronóstico que los que se originan en el dedo y la cavidad oral. En este contexto y dado que la malignidad de las neoplasias se puede evaluar en base a perfiles de expresión de moléculas asociadas a oncogénesis, **se propone que los CCE de la piel de perro (*Canis lupus familiaris*) presentan un perfil de expresión de proliferación y angiogénesis comparativamente más bajo que los CCE del dedo y la cavidad oral.**

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de marcadores asociados a proliferación y angiogénesis en carcinoma de células escamosas de perro de la piel, los dedos y la cavidad oral.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión de marcadores asociados a proliferación en CCE de perro de la piel, los dedos y la cavidad oral.
2. Determinar la expresión de un marcador asociado a angiogénesis en CCE de perro de la piel, los dedos y la cavidad oral.
3. Comparar el perfil de expresión de estos marcadores en las distintas localizaciones anatómicas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Unidad biológica

Se utilizaron muestras de CCE de perros obtenidas desde la piel, los dedos o la cavidad oral. Estas muestras corresponden a tejidos embebidos en parafina sólida, provenientes de archivos de dos laboratorios particulares de anatomía patológica, los que fueron enviados rutinariamente para diagnóstico.

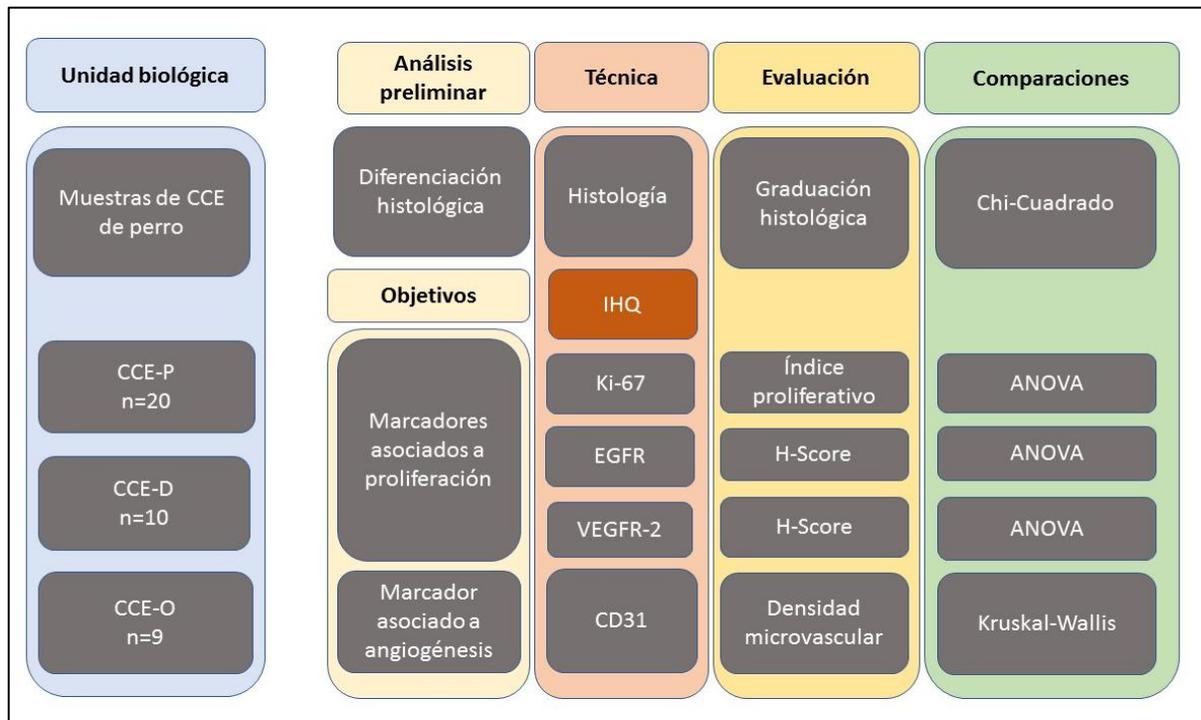
Las muestras de piel provinieron de localizaciones anatómicas como el abdomen (n=8), la ingle (n=4), los miembros (n=2), el prepucio (n=2), el escroto (n=1), la cabeza (n=1), el plano nasal (n=1), el tronco (n=1). Las muestras del dedo no presentaron especificación de la localización. Las muestras orales provinieron de la mucosa gingival (n=6) y lengua (n=3).

Se utilizaron 20 muestras de piel, 10 muestras de dedo y 9 muestras de la cavidad oral, resultando en un total de 39 muestras.

Diseño experimental

Las muestras fueron separadas en tres grupos: 1) CCE de piel (CCE-P), 2) CCE de dedos (CCE-D) y 3) CCE de cavidad oral (CCE-O). Todas las muestras fueron evaluadas mediante graduación histológica y se realizó la técnica inmunohistoquímica para la detección de marcadores asociados a proliferación (Ki-67, EGFR y VEGFR-2) y angiogénesis (CD31) como se detallará más adelante. Finalmente, las láminas de inmunohistoquímica de todos los marcadores fueron evaluadas y comparadas, según los métodos mencionados más adelante (Figura 2).

Figura 2. Diseño experimental.



CCE-P: Carcinoma de células escamosas de piel. **CCE-D:** Carcinoma de células escamosas de los dedos. **CCE-O:** Carcinoma de células escamosas oral. **IHQ:** Inmunohistoquímica. **ANOVA:** Análisis de varianza.

Histología

Técnica: Las muestras fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina (FF-EP), cortadas en láminas de 4 µm de espesor, montadas en portaobjetos. Las láminas fueron desparafinadas en xilol y rehidratadas en graduaciones descendentes de alcohol y agua destilada. Luego fueron teñidas con hematoxilina de Harris, diferenciadas en etanol-ácido 1%, azuladas con carbonato de litio, teñidas con eosina y finalmente, deshidratadas en alcohol a concentraciones crecientes, aclaradas en xilol y montadas con un cubreobjetos (Fischer *et al.*, 2008).

Análisis: Se describieron las características histológica y citológica de cada muestra. Luego fueron clasificadas en grados histológicos según los criterios descritos en la tabla 1. Este

análisis fue realizado por dos evaluadores, Dr. Federico Cifuentes y Cristian Erazo. En caso de haber discrepancias se utilizaron los valores del evaluador con mayor experiencia (Dr. Federico Cifuentes). El grado 1 representa los tumores bien diferenciados, el grado 2 los moderadamente diferenciados, y el grado 3 los pobremente diferenciados (Goldschmidt y Shofer, 1992). Cada característica del CCE está definida en el Anexo 1 y 2.

Tabla 1. Criterios para la graduación histológica del CCE Canino (Goldschmidt y Shofer, 1992).

<i>Características histológicas</i>	<i>Grado 1</i>	<i>Grado 2</i>	<i>Grado 3</i>
<i>Patrón de crecimiento</i>	Trabéculas e islas.	Islas y nidos.	Nidos, mantos y cordones.
<i>Grado de queratinización</i>	Gran cantidad de láminas concéntricas. Abundante cantidad de citoplasma eosinofílico	Moderada a baja cantidad de láminas concéntricas. Moderada cantidad de citoplasma eosinofílico a anofílico	Células disqueratóticas o ausencia de queratinización. Escasa cantidad de citoplasma anofílico
<i>Grado de anisocariosis</i>	Anisocariosis baja con núcleos grandes y sin nucléolos grandes o medianos.	Anisocariosis moderada con núcleos grandes y vesiculares o heterocromáticos, con 0-1 nucléolo mediano.	Anisocariosis alta con núcleos eucromáticos o hipercromáticos con con 1 o más nucléolos grandes.
<i>Actividad mitótica</i>	Baja (<6 en 10 campos de 400x), mitosis atípica ausente.	Moderada (7-17 en 10 campos de 400x), baja a moderada cantidad de mitosis atípicas.	Alta (>18 en 10 campos de 400x), alta cantidad de mitosis atípicas.

A cada característica histológica: patrón de crecimiento, grado de queratinización, grado de anisocariosis y actividad mitótica, se le asignó un número según la columna del grado que corresponde de 1 a 3. Luego se promediaron los números de las cuatro características y esto nos entregó el grado histológico ponderado de 1 a 3. Según la siguiente fórmula diseñada para este proyecto.

$$\mathbf{GH} = (\mathbf{A}_{1-3} + \mathbf{B}_{1-3} + \mathbf{C}_{1-3} + \mathbf{D}_{1-3}) / 4$$

GH = Graduación histológica. **A₁₋₃** = Patrón de crecimiento, según columna. **B₁₋₃** = Grado de queratinización, según columna. **C₁₋₃** = Grado de anisocariosis, según columna. **D₁₋₃** = Actividad mitótica, según columna.

Inmunohistoquímica

Los bloques FF-EP se cortaron con un micrótopo a un espesor de 4 µm y las láminas fueron montadas en porta objetos silanizados. Luego, las láminas de tejidos fueron desparafinadas y rehidratadas de la misma manera que el procedimiento histológico. La recuperación antigénica (RA) fue llevada a cabo, mediante alta temperatura (HIER, por su acrónimo en inglés) en una vaporera (Oster® modelo 5711) a aproximadamente 90 °C por 40 min, dentro de un contenedor cerrado con *buffer* citrato (pH 6,0; 0,1M); o mediante proteólisis (PIER, por su acrónimo en inglés) con proteinasa K en *buffer* Tris-EDTA-CaCl₂ (pH 8,0) en una estufa termorregulada a 37 °C por 15 min, dentro de una cámara húmeda, según la RA óptima para cada anticuerpo (tabla 2). Se realizaron lavados con PBS 1X (pH 7,4; 0,01M), bloqueo de la actividad de peroxidasa endógenas se realizó con H₂O₂ (0,3%) en metanol por 15 min, y bloqueos de proteínas endógenas no específicas se realizaron con suero normal equino 2,5% (R.T.U. Vectastain® Universal Elite® ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA) por 15 min. Se realizó la incubación con anticuerpos primarios contra los antígenos EGFR, VEGFR-2, CD31 y Ki-67 (tabla 2), durante toda la noche (14-16 h) a 4 °C, y se determinó una dilución estándar para cada una de las muestras. Esta dilución se obtuvo mediante ensayos a partir de la dilución recomendada por el fabricante y/o por publicaciones previas (tabla 2), buscando el equilibrio entre una marca intensa del cromógeno y ausencia de fondo. Luego se realizó, la incubación con anticuerpo secundario biotinilado (R.T.U. Vectastain®

Universal Elite® ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA) por 30 min, Streptavidin-HRP (R.T.U. Vectastain® Universal Elite® ABC Kit, Vector Laboratories, CA, USA) por 15 min, se agregó el cromógeno 3,3´ Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB substrate kit 957D-50, Cell Marque®, Sigma-Aldrich Company, CA, USA) por 90-120 s, se realizó contratincción con hematoxilina de Mayer por 20 s. Las muestras fueron deshidratadas en alcohol a concentraciones crecientes, aclaradas en xilol y montadas con un cubreobjetos (Tylor y Rudbeck, 2013).

Se realizaron controles positivos para cada anticuerpo según se menciona en la tabla 2, de tejidos de origen humano y/o en su defecto de perro (*Canis lupus familiaris*). Se realizaron controles negativos internos de tejido de perro (*Canis lupus familiaris*) aparentemente sano de las diferentes localizaciones utilizadas como piel (excluyendo dedo), piel del dedo y la cavidad oral. Se realizaron controles negativos metodológicos, a cada una de las muestras del estudio. A estas, no se les aplicó el anticuerpo primario a estudiar. Este último control se utilizó para tener una marca neutral en las evaluaciones.

Tabla 2. Anticuerpos primarios

<i>Anticuerpo</i>	<i>Origen</i>	<i>Tipo</i>	<i>Proveedor®</i>	<i>Propósito</i>	<i>Control positivo</i>	<i>Diluciones</i>	<i>RA</i>
<i>Ki-67</i>	Ratón	Monoclonal	Clon MIB-1 Dako	Proliferación	Linfonodo	1:100	HIER ^a
<i>EGFR</i>	Ratón	Monoclonal	Clon 528, MA- 512875. Thermo Fisher	Proliferación	Piel	1:100	PIER ^c
<i>VEGFR-2</i>	Conejo	Policlonal	Ab2349 Abcam	Proliferación	Riñón	1:200	HIER ^a
<i>CD31</i>	Ratón	Monoclonal	Clon JC70A Dako	Angiogenesis	Riñón	1:50	HIER ^b

RA= Recuperación antigénica. **HIER**= RA inducida por calor. **PIER**= RA inducida por proteólisis. **a.** Al-Dissi *et al*, (2007). **b.** Carvalho *et al.*, (2013). **c.** Evaluada según una batería de RA en un estudio preliminar (Unidad de investigación).

Índice proliferativo

Se describió la distribución de la marca de Ki-67, dentro del tumor y su ubicación dentro de las células neoplásicas. Mediante un programa computacional (ImageJ, NIH, USA) se contaron los núcleos positivos (marcados con el color del cromógeno) a Ki-67 en un total de 1000 células, según lo descrito por Al-Dissi *et al*, (2007). Esto se realizó en cinco a siete fotografías (150-200 células por fotografía) tomadas en un microscopio óptico (Motic BA310E®, motic®) en campos de 400X con una cámara fotográfica (Moticam 580®, Motic®), con una calidad de imagen de 2560x1920 pixeles.

Evaluación para EGFR y VEGFR-2

Se describió la distribución de la intensidad de la marca dentro del tumor y la localización subcelular de EGFR y VEGFR-2. Se evaluó la expresión de ambos marcadores, mediante un método semicuantitativo, *Score* Híbrido o H-score, de acuerdo con lo descrito por Mazières *et al.* (2013). El cual fue determinado por dos evaluadores (a ciegas de la metodología) en cinco fotografías, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Para obtener este *score* se determinó el porcentaje de células marcadas con cada intensidad (0-100%), en cada muestra, según la fórmula descrita más adelante. La intensidad de la marca se categorizó como: 0 ausente, 1 débil, 2 moderada, 3 fuerte. Se multiplicó el porcentaje de células con cada intensidad por el índice de la categoría de la intensidad (0-3), luego se sumaron todas las categorías dando como resultado un *score* que tiene un rango de 0-300. Se utilizó el control negativo metodológico de cada muestra como referencia del nivel de intensidad “ausente”.

$$\mathbf{H\text{-}Score = [0 \times (\% \text{ Co}) + 1 \times (\% \text{ Ci}) + 2 \times (\% \text{ Cii}) + 3 \times (\% \text{ Ciii})]}$$

% Co = Porcentaje de células de intensidad ausente.

% Ci = Porcentaje de células de intensidad débil.

% Cii = Porcentaje de células de intensidad moderada.

% Ciii = Porcentaje de células de intensidad fuerte.

Densidad microvascular (MVD)

Se describió la ubicación subcelular de la expresión de CD31 en los endotelios. Para este análisis se utilizaron los mismos instrumentos anteriormente descritos. Se cuantificaron los vasos sanguíneos peritumorales positivos (marcados con el color del cromógeno) a CD31, en un área total de cinco fotografías por cada muestra. Se consideraron vasos sanguíneos pequeños cuando tenían un diámetro menor a 30 μm o con ausencia de pared muscular gruesa, según lo descrito previamente por Carvalho *et al.* (2013).

Análisis de resultados

Los resultados de la graduación histológica fueron presentados en una tabla de contingencia y se les realizó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2). Los resultados del índice proliferativo, de los H-Score (EGFR y VEGFR-2) y la densidad microvascular, fueron analizados para determinar si presentan una distribución normal mediante la prueba D'Agostino-Pearson. Los primeros tres presentaron una distribución normal y fueron comparados mediante Análisis de Varianza (ANOVA). La densidad microvascular presentó una distribución no normal y se comparó mediante la prueba de Kruskal Wallis. Se utilizó un nivel de significancia de 0,05. Estos análisis fueron realizados con el software Graph Pad Prism 6.0 ®.

Perfil de marcadores de proliferación y angiogénesis

De modo de responder la hipótesis y comparar la expresión de marcadores asociados a proliferación y angiogénesis en las distintas localizaciones anatómicas, se formuló un perfil de expresión de moléculas asociadas a proliferación (Ki-67, EGFR y VEGFR-2) y angiogénesis (CD31). Estos marcadores han sido previamente utilizados por otros autores para evaluar en CCE y/u otras neoplasias e identificar diferencias en su malignidad. Por ejemplo, en CCE cutáneo en perros (Al-Dissi *et al.*, 2007) y carcinoma mamario en perras (Carvalho *et al.*, 2013).

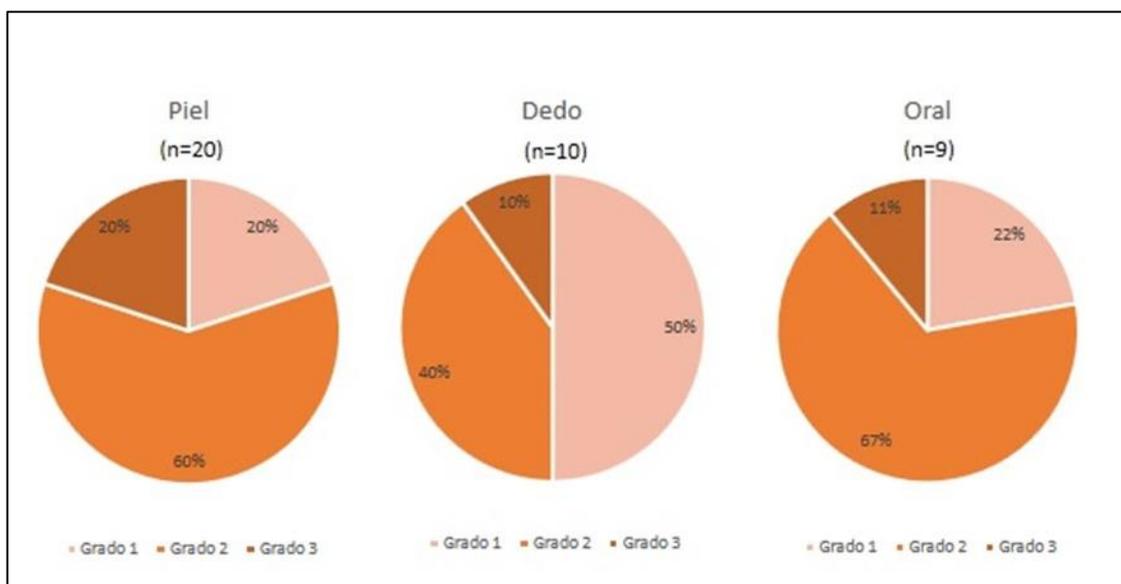
En este estudio se estableció que un tumor es menos maligno que otro cuando los cuatro marcadores son comparativamente menores, siempre y cuando esta diferencia sea estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

6.1. Características histológicas y graduación histológica del CCE de perro.

En las tres localizaciones anatómicas (piel (CCE-P), dedos (CCE-D) y cavidad oral (CCE-O)) se encontraron los tres grados histológicos en diferentes proporciones, pero no hubo diferencias significativas entre ellos ($P= 0,47$). Sin embargo, en la piel y la cavidad oral predominaron los CCE moderadamente diferenciados (grado 2), a diferencia del CCE-D donde fueron los bien diferenciados (grado 1) (figura 3).

Figura 3. Distribución de carcinoma de células escamosas (CCE) en perro según grado histológico y localización anatómica ($P= 0,47$).



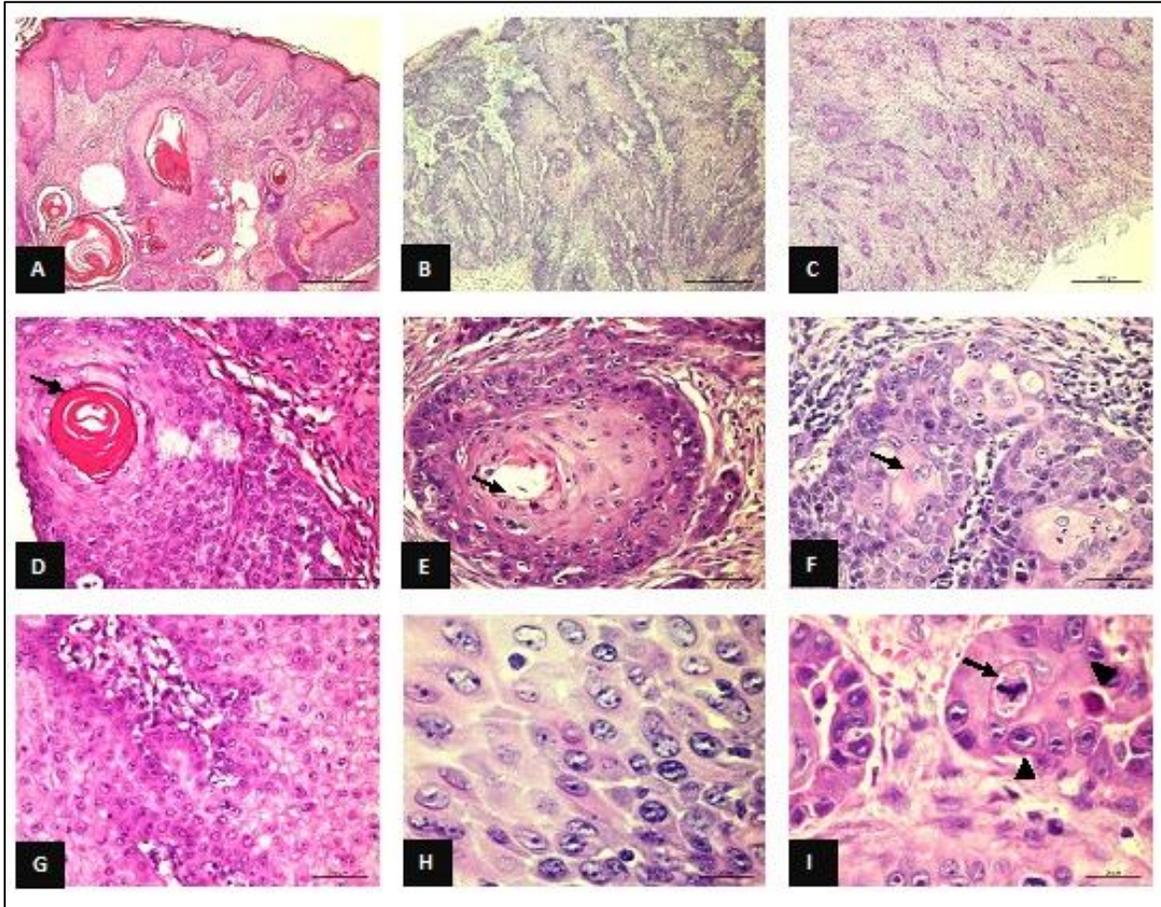
En el 28% (11/39) de los casos, los tumores estuvieron compuestos por estructuras asociadas a una mayor diferenciación histológica como trabéculas e islas (figura 4, A-B). En un 72% (28/39) de los casos estuvieron compuestos por nidos, cordones, grupos y células individuales (figura 4, C).

Se observó queratinización en el 79% (31/39) de las muestras (figura 4, D-E). Sin embargo, en un 21% (8/39) de los CCE se encontró ausencia de estas estructuras o en su lugar algunas células neoplásicas con disqueratosis (figura 4, F).

En relación con las características nucleares del CCE, la anisocariosis fue leve en un 23% (9/39), moderada en un 62% (24/39) y severa en un 15% (6/39). El tipo de cromatina fue vesiculada en un 23% (9/39), heterogénea en un 69% (27/39) y eucromática en un 8% (3/39). Los tamaños de los nucléolos fueron pequeños en un 56% (22/39), medianos en un 39% (15/39) y prominentes en un 5% (2/39). Otras características nucleares estuvieron presentes en menor frecuencia como la presencia de núcleos atípicos y/o gigantes en un 21% (8/39), mitosis atípicas en un 28% (11/39) y en un 10% (4/39) la presencia de células multinucleadas y nucléolos gigantes (figura 4, I). La actividad mitótica fue baja en un 18% (7/39), moderada en un 21% (8/39) y alta en un 61% (24/39).

En el 90% (35/39) de las muestras se observó infiltrado de linfocitos y células plasmáticas peritumorales e incluso grupos de neutrófilos dentro del tumor.

Figura 4. Fotomicrografías de características histológicas del carcinoma de células escamosas de perros.



A. CCE bien diferenciado con trabéculas e islas grandes de células. **B.** CCE moderadamente diferenciado con islas grandes, pequeñas y nidos de células. **C.** CCE pobremente diferenciado con nidos y cordones de células. **D.** CCE bien diferenciado con grandes láminas concéntricas o *perlas* de queratina (Flecha). **E.** CCE moderadamente diferenciado con queratinización baja y pequeñas láminas concéntricas de queratina (Flecha). **F.** CCE pobremente diferenciado con células disqueratóticas escasas (Flecha) y sin láminas concéntricas de queratina. **G.** CCE bien diferenciado con células con escasa anisocitosis y anisocariosis. **H.** CCE moderadamente diferenciado con moderada anisocitosis, anisocariosis y nucléolos pequeños ocasionales. **I.** CCE pobremente diferenciado con células con intensa anisocitosis, anisocariosis, uno o más nucléolos prominentes (Puntas de flecha) y mitosis atípicas ocasionales (Flecha). **Barras.** A-C: 500 μ m. D-G: 50 μ m. H-I: 20 μ m. **Tinción.** H&E.

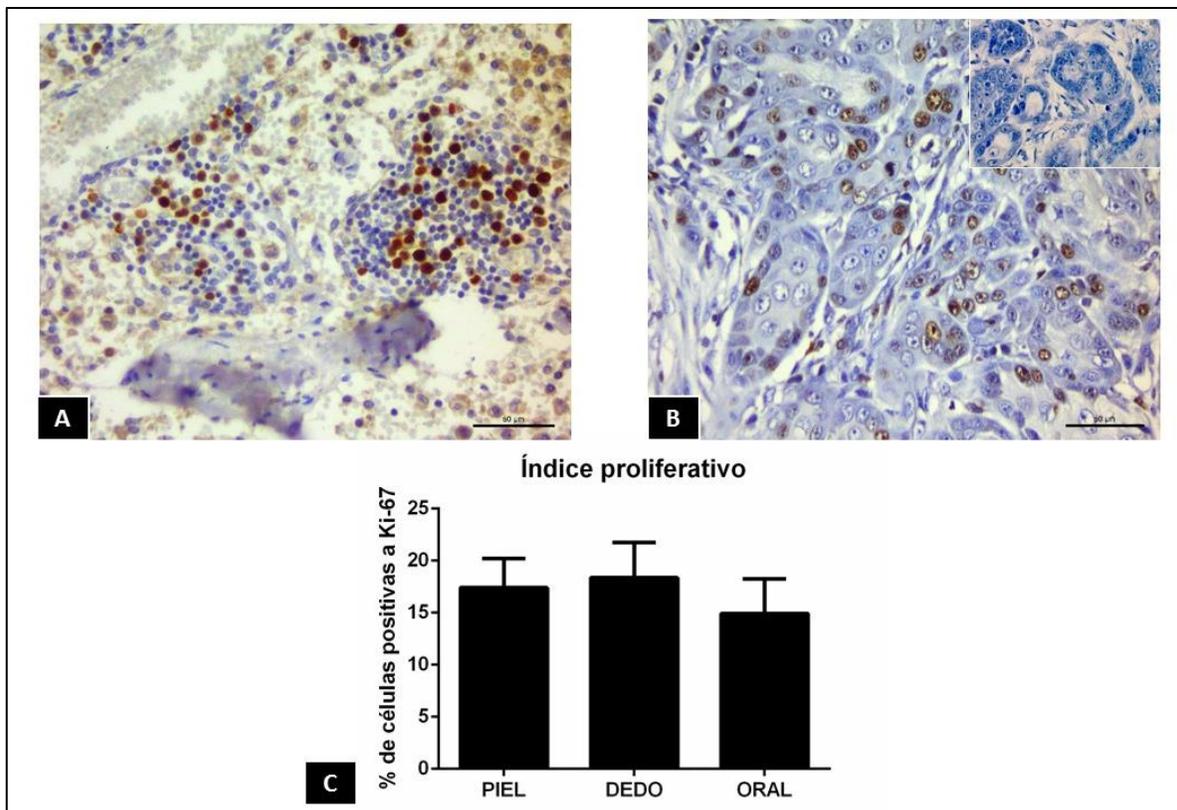
6.2. Expresión de marcadores asociados a proliferación

6.2.1. Índice proliferativo

La marca nuclear de Ki-67 se ubicó principalmente en las células basales de las estructuras neoplásicas (trabéculas e islas), pero en algunos casos se observó en células del centro de estas estructuras o en células dispuestas individualmente (figura 5, A-B).

Las medias del índice proliferativo de las distintas localizaciones de CCE fueron un 17,41% ($\pm 2,78$) en la piel, un 18,36% ($\pm 3,39$) en los dedos y un 14,93% ($\pm 3,32$) en la cavidad oral (figura 5, C). Estos valores no fueron significativamente diferentes entre las localizaciones anatómicas de este estudio ($P=0,79$).

Figura 5. Expresión de Ki-67 e índice proliferativo en carcinoma de células escamosas de perro.



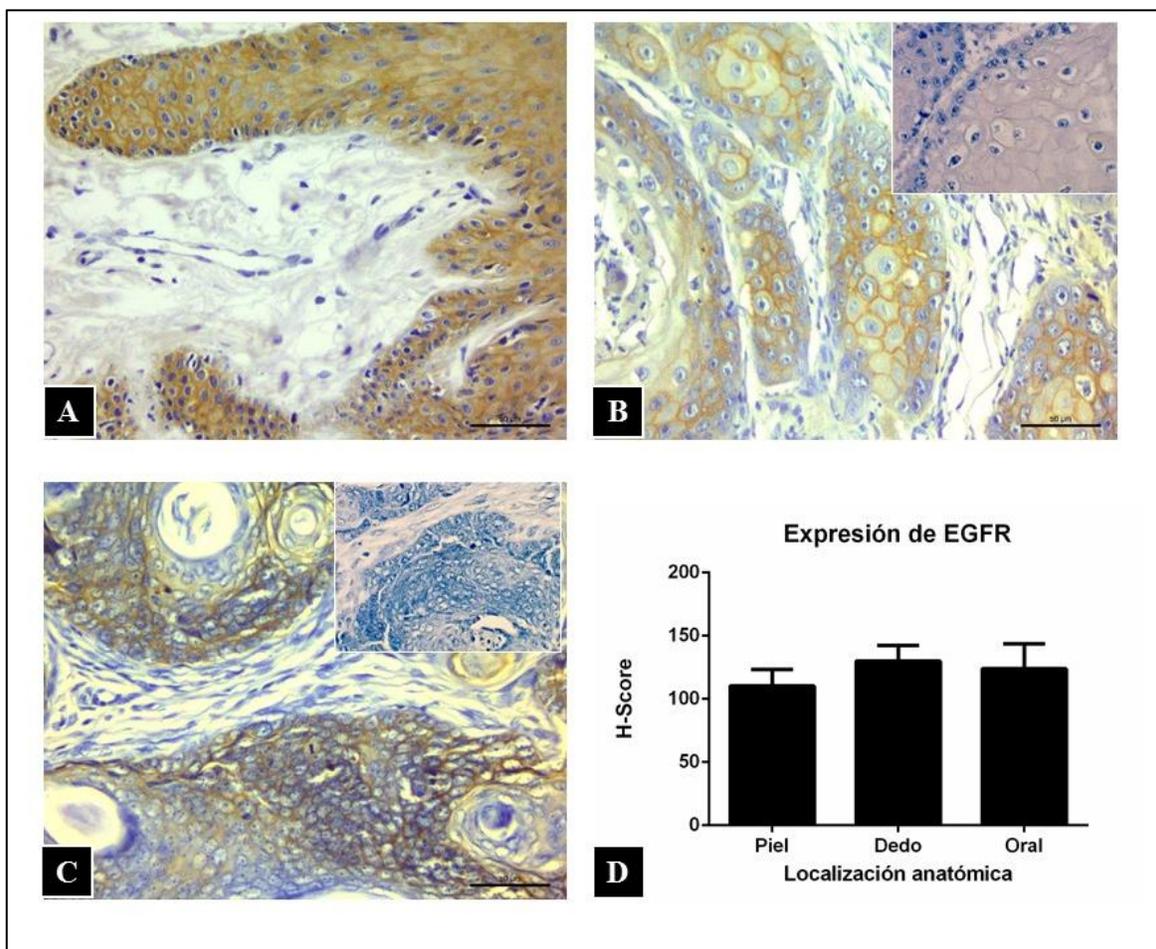
A-B. Expresión de Ki-67 en carcinoma de células escamosas (CCE) en perro, mediante inmunohistoquímica. **A.** Control positivo de Ki-67, linfonodo de perro. **B.** CCE cutáneo pobremente diferenciado. **Recuadro.** Control negativo metodológico. **Barras:** 50 μ m. **Cromógeno:** DAB. **Contratinción:** Hematoxilina de Mayer. **C.** Índice proliferativo según localización anatómica del CCE (P= 0,79).

6.2.2. Expresión de EGFR

En general, la expresión de este marcador se presentó en dos patrones. El primero y más frecuente (el 65% de todas las muestras) presentó una expresión más intensa en la zona intermedia de las trabéculas e islas, más débil en el centro y fue ausente en las células basales y/o en las estructuras neoplásicas más pequeñas (figura 6, B). El segundo patrón consistió en una expresión homogénea en todas las células de las estructuras neoplásicas (figura 6, C). A nivel subcelular, se observó una marca granular fina predominantemente en la membrana citoplasmática, con un menor grado de expresión citoplasmática (figura 6, A-C).

La media de la expresión de EGFR (estimada mediante H-Score) en el CCE cutáneo, digital y oral, fue 110,0 (\pm 11,77), 129,9 (\pm 12,45) y 124 (\pm 19,82) respectivamente. Los valores obtenidos no fueron significativamente diferentes entre las localizaciones anatómicas de este estudio (P= 0,57) (figura 6, D).

Figura 6. Expresión de EGFR y H-Score de carcinoma de células escamosas de perro.



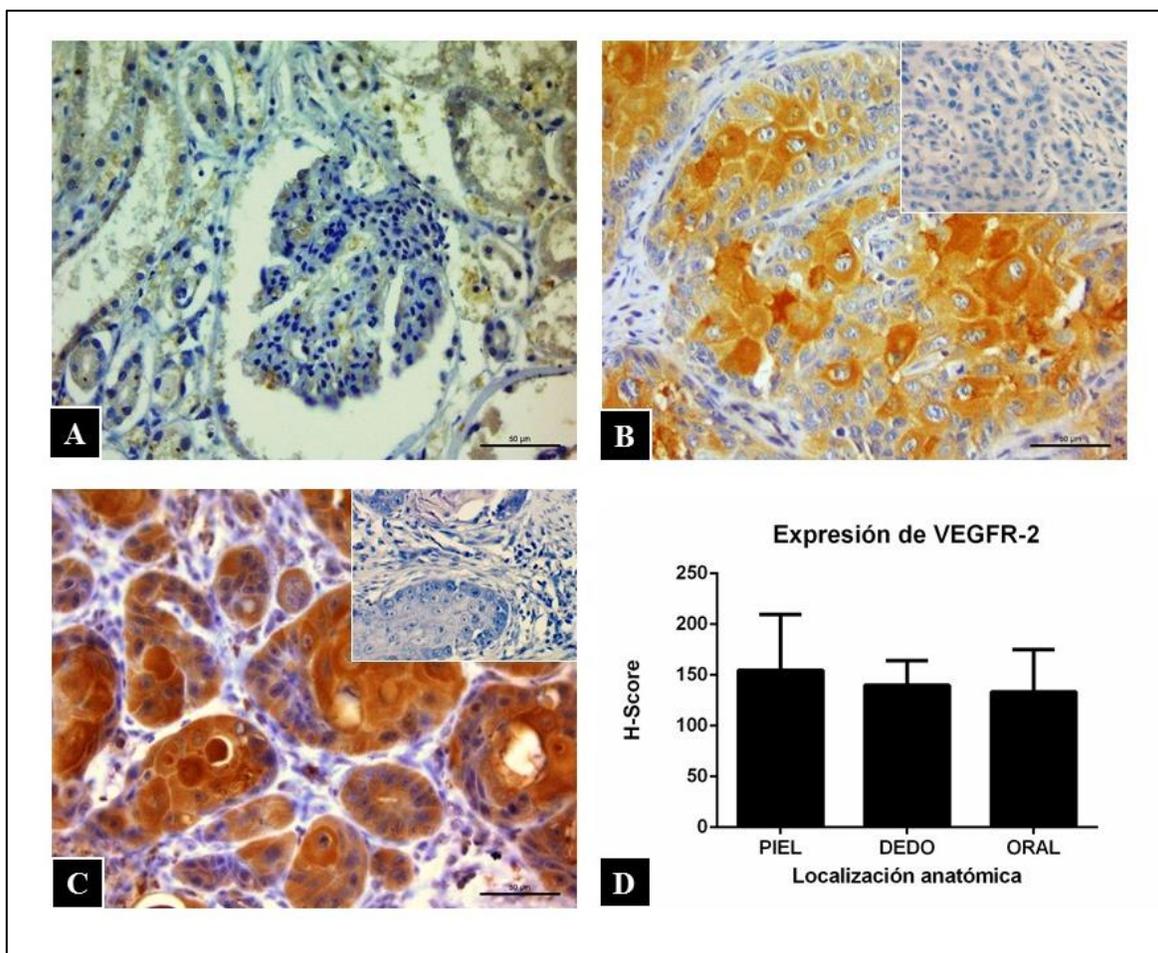
A-C. Expresión de EGFR en carcinoma de células escamosas (CCE) en perro, mediante inmunohistoquímica. **A.** Control positivo de EGFR, piel de perro. **B.** CCE digital moderadamente diferenciado, patrón de marca central y pérdida de marca en las células basales y en las estructuras pequeñas. **C.** CCE cutáneo moderadamente diferenciado, patrón de marca homogénea en todas las estructuras. **Recuadros.** Controles negativos metodológicos. **Barras:** 50 µm. **Cromógeno:** DAB. **Contratinción:** Hematoxilina de Mayer. **D.** Expresión de EGFR según localización anatómica del CCE en perro, mediante medición semicuantitativa de H-Score ($P= 0,57$).

6.2.3. Expresión de VEGFR-2

En general, la expresión de este marcador se presentó en dos patrones. El primer patrón se presentó con una mayor frecuencia (70%) y se caracterizó por una mayor intensidad en el centro de las estructuras grandes (trabéculas e islas) y fue más débil hacia las células basales, en los nidos y células individuales (figura 7, B). El segundo patrón y menos frecuente (30%) se caracterizó por una expresión homogénea en todas las estructuras (figura 7, C). La expresión a nivel subcelular fue de tipo granular y predominó en el citoplasma (figura 7, A-C).

Las medias de la expresión de VEGFR-2 (estimada mediante H-Score) en las diferentes localizaciones del CCE en perro fueron 154,6 (\pm 12,27) en piel, 140 (\pm 7,67) en dedos y 133,4 (\pm 13,93) cavidad oral. Estos resultados no fueron significativamente diferentes ($P= 0,47$) (Figura 7, D).

Figura 7. Expresión de VEGFR-2 y H-Score en carcinoma de células escamosas de perro.



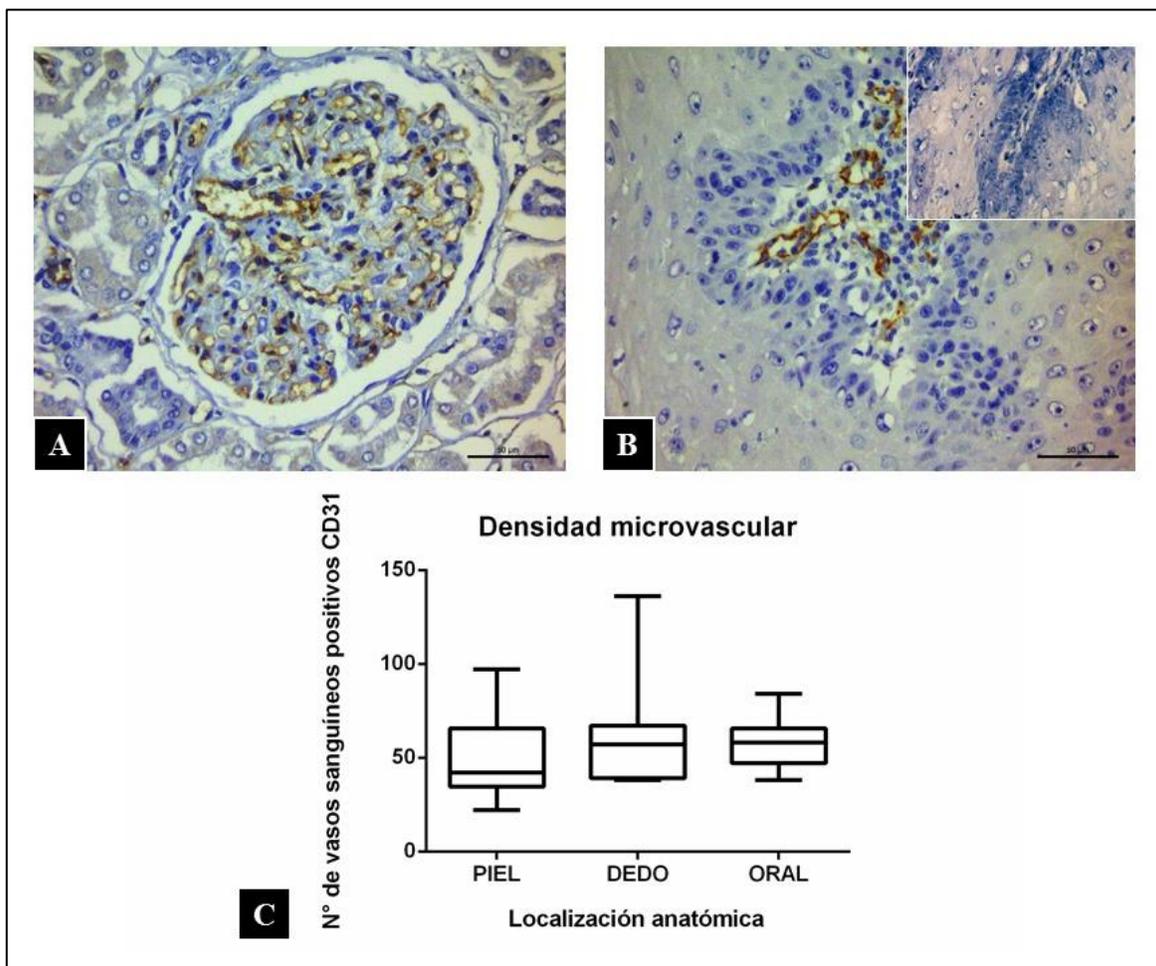
A-C. Expresión de VEGFR-2 en carcinoma de células escamosas (CCE) de perro, mediante inmunohistoquímica. **A.** Control positivo de VEGFR-2, riñón de perro. **B.** CCE digital pobremente diferenciado, patrón de expresión central y pérdida de marca en las células basales y en las estructuras pequeñas. **C.** CCE cutáneo moderadamente diferenciado, patrón de marca homogénea en todas las estructuras. **Recuadros.** Controles negativos metodológicos. **Barras:** 50 µm. **Cromógeno:** DAB. **Contratinción:** Hematoxilina de Mayer. **D.** Expresión de VEGFR-2 según localización anatómica del CCE en perros, mediante medición semicuantitativa de H-Score ($P= 0,47$).

6.3. Expresión de marcador asociado a angiogénesis

La marca inmunohistoquímica para CD31 se encontró en las células endoteliales peritumorales y en ellas se ubicó principalmente en el citoplasma (figura 8, A-B). Las medianas de la densidad microvascular (MVD) fueron: 42 para la piel, 59,5 para los dedos y

58 para la cavidad oral. Al comparar estas localizaciones se determinó que no hubo diferencias significativas entre las localizaciones del CCE en perro ($P= 0,20$) (figura 8-C).

Figura 8. Expresión de CD31 y densidad microvascular en carcinoma de células escamosas de perro.



A-B. Expresión de CD31 en carcinoma de células escamosas (CCE) de perro, mediante inmunohistoquímica. **A.** Control positivo de CD31, riñón humano. **B.** CCE oral bien diferenciado, vasos sanguíneos peritumorales. **Recuadro.** Control negativo metodológico. **Barras.** 50 μm . **Cromógeno.** DAB. **Contratinción.** Hematoxilina de Mayer. **C.** Densidad microvascular según localización anatómica del CCE en perros ($P=0,20$).

6.4. Perfil de moléculas asociadas a proliferación y angiogénesis

Los resultados de las cuatro evaluaciones mostraron que no hubo diferencias significativas en las distintas localizaciones del carcinoma de células escamosas en perro de este estudio. Esto sugiere que en los CCE de piel tienen un comportamiento similar en cuanto a proliferación y angiogénesis respecto de los provenientes de los dedos y la cavidad oral en los perros.

7. DISCUSIÓN

El carcinoma de células escamosas (CCE) es una de las neoplasias malignas más frecuentes en perros (*Canis lupus familiaris*). Esta neoplasia puede desarrollarse en la mayoría de las localizaciones anatómicas donde hay epitelio (Gross *et al.*, 2005; North y Banks, 2009; Withrow *et al.*, 2013).

La literatura muestra que, en perros los CCE de los dedos y la cavidad oral presentan una mayor agresividad y un peor pronóstico con relación al CCE de la piel (North y Banks, 2009; Withrow *et al.*, 2013). Sin embargo, no hay información que explique esta diferencia. Las posibles diferencias entre los CCE podrían derivar tanto de las características de las células neoplásicas como las del estroma en que se encuentran. En el presente trabajo se estudiaron algunas características propias de las células neoplásicas y el estroma.

En este estudio se utilizó la graduación histológica de Goldschmidt y Schofer (1992) que evalúa la diferenciación histológica y resume las características citológicas e histológicas predominantes del CCE canino. En el presente estudio no hubo diferencias significativas en los grados histológicos entre las tres localizaciones anatómicas de CCE. Esto es similar a los resultados descritos por Belluco *et al* (2013), los cuales no mostraron diferencias en las graduaciones histológicas entre los CCE digitales que presentan o no metástasis. En cambio, en los CCE orales de perro hay resultados contrapuestos; mientras Fulton *et al* (2013) muestra que no hay asociación entre el grado histológico y el pronóstico, Mestrinho *et al* (2014) muestra que si la hay. Cabe señalar que los estimadores de supervivencia fueron distintos en ambos estudios. Los primeros autores utilizaron la mediana de supervivencia como estimador de pronóstico (Fulton *et al.*, 2013), en cambio los segundos utilizaron la mediana del intervalo libre de enfermedad (Mestrinho *et al.*, 2014). Los resultados de este estudio podrían ser explicados porque la graduación histológica utilizada evalúa el tumor en forma global, lo que podría no ser representativo de tumores heterogéneos como los CCEs. En algunos CCEs de este estudio se observaron grandes áreas de tejido diferenciado, con escasas áreas de invasión. Dado que la invasión es el parámetro de mayor malignidad, es posible que la evaluación de todo el tumor no sea representativa de su grado de malignidad. Respecto de esto, un grupo

de investigadores compararon una graduación de borde de invasión con la graduación histológica tradicional, en CCE cutáneo y oral de perro. En este estudio se encontró que el CCE de la cavidad oral presenta una graduación de borde de invasión mayor que en la piel, situación que no se evidenció con la graduación histológica tradicional (Nagamine *et al.*, 2017).

La proliferación es un proceso indispensable y característico de las neoplasias y su estimación mediante el índice proliferativo (IP) ha sido relacionada a mayor malignidad y menor supervivencia en tumores caninos como el cáncer mamario (Peña *et al.*, 1998). En este estudio no se encontraron diferencias en relación con el IP entre las tres localizaciones anatómicas de CCE en perros. En otros estudios se ha observado que los CCE de piel tienen un IP similar a tumores cutáneos benignos (Al-Dissi *et al.*, 2007) lo que apoyaría indirectamente la idea de que esta localización es menos agresiva. Por otro lado, se ha descrito un mayor IP en CCE-O de perros, estimado por la expresión de PCNA, lo que fue relacionado a un peor pronóstico (Mestrinho *et al.*, 2014). No se dispone de estudios que evalúen el IP en CCE de dedo. Si bien el IP ha sido una buena herramienta para evaluar pronóstico o agresividad en diversas neoplasias, no ha demostrado establecer una diferencia entre los CCE de las distintas localizaciones estudiadas. Estos resultados refuerzan la idea de que la evaluación de otros parámetros de malignidad, como la graduación del frente de invasión, pudiese ser más útil para diferenciar estos casos.

Uno de los métodos para evaluar la proliferación es estimando la expresión de los receptores relacionados a proliferación, y que fue estimada en el presente estudio por medio de receptores tirosina quinasa (RTK), EGFR y VEGFR-2. Numerosos autores han relacionado una mayor expresión de EGFR con mayor agresividad y/o peor pronóstico en cáncer. En este estudio no hubo diferencias en las expresiones de EGFR y VEGFR-2 entre las tres localizaciones de CCE en perros. En humanos con CCE-O, una mayor expresión de EGFR fue asociada con mayor número de metástasis a linfonodos, pero no con supervivencia (Gröbe *et al.*, 2014). Por otro lado, los datos obtenidos por Jiang *et al.*, (2015) en CCE de esófago de humanos, muestran que existe asociación positiva entre una mayor expresión de EGFR y peor pronóstico. No hay reportes de la expresión de EGFR en CCE de perros. Sin embargo, existen estudios con este marcador en otras neoplasias caninas. Por ejemplo, en

perras con carcinoma mamario, una mayor expresión de EGFR se relaciona positivamente con el tamaño de la neoplasia, grado histológico y estadificación clínica (Carvalho *et al.*, 2013). De forma similar, se observó que hay una mayor expresión de EGFR en neoplasias del sistema nervioso de alto grado histológico (Dickinson *et al.*, 2006).

Respecto de VEGFR-2, se ha observado una mayor expresión de este marcador en humanos con CCE de pulmón, lo que estaría asociado a un peor pronóstico (Holzer *et al.*, 2013). En el caso de los perros con CCE de piel, existe un estudio sobre la expresión de VEGFR-2, en el que no se encontraron diferencias entre CCE de piel y otra neoplasia cutánea benigna (Al-Dissi *et al.*, 2007), pero no se evaluó su relación con pronóstico. En otras neoplasias caninas como las neoplasias del SNC de alto grado histológico se observó una mayor expresión de VEGFR-2 en relación con su contraparte de menor grado histológico (Dickinson *et al.*, 2006) y en mastocitoma cutáneo una mayor expresión de VEGFR-2 se correlacionó con un mayor grado histológico, disminución del tiempo de supervivencia, disminución del intervalo libre de enfermedad, incremento de la recurrencia local e incremento en la tasa de metástasis (Thompson *et al.*, 2015). Los resultados del presente estudio sugieren que la expresión de estos receptores no explicaría la diferencia en la agresividad y pronóstico en las tres localizaciones evaluadas.

La angiogénesis es otra característica que favorece la progresión del cáncer. En nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas en la densidad microvascular (MVD) entre las tres localizaciones anatómicas estudiadas. Esto difiere de lo que ocurre en humanos con CCE-O, en donde se ha observado que una mayor MVD está relacionada con mayor capacidad de metástasis y/o peor pronóstico (Xia *et al.*, 2014). En otro estudio, la MVD en CCE-P canino fue mayor en comparación con tricoepiteliomas. En este ejemplo, esta diferencia podría estar explicada por la comparación entre una neoplasia benigna y una maligna, en donde la angiogénesis cumple un rol más relevante y es distinta en ambas condiciones (De Palma *et al.*, 2017). Como ya se mencionó en este estudio, se observó que las diferentes localizaciones tienen una MVD similar, lo que sugiere que las diferencias descritas entre las localizaciones anatómicas del CCE en perros no estarían relacionadas al nivel de angiogénesis. Sin embargo, sería interesante evaluar otros aspectos del proceso

angiogénico como la expresión de moléculas pro-angiogénicas y/o la proliferación de nuevos vasos sanguíneos.

Los resultados de este trabajo sugieren que los carcinomas de células escamosas (CCE) en perro (*Canis lupus familiaris*) de piel (CCE-P), dedos (CCE-D) y cavidad oral (CCE-O) son similares al compararlos por medio de este perfil de moléculas asociadas a proliferación y angiogénesis. Por lo tanto, las diferencias en la agresividad y pronóstico de estas tres localizaciones anatómicas no estarían explicadas por distintos niveles de proliferación y angiogénesis. Dado el tamaño muestral relativamente pequeño de este estudio, se hace necesario confirmar estas observaciones aumentando ese tamaño y recurriendo a técnicas de mayor sensibilidad.

Dado que el cáncer está inmerso en un microambiente tumoral (MAT) único, en este podríamos encontrar algunas explicaciones biológicas al comportamiento agresivo que diferencian al CCE-P del CCE-D y CCE-O. Los componentes de este MAT son fibroblastos asociados a cáncer, células inflamatorias, células inmunes con actividad inmunosupresora y la matriz extracelular. Este estudio tomó en consideración a los vasos sanguíneos peritumorales como un componente del MAT, aunque como se mencionó anteriormente no hubo diferencias significativas. Si bien la angiogénesis está relacionada a la progresión tumoral, el estudio de la invasión podría reflejar de mejor manera la agresividad de una neoplasia, especialmente en su relación con su estroma tumoral. En este contexto, la lisis del hueso subyacente es una característica que diferencia a los CCE-D y CCE-O, de los cutáneos, pero no se conoce si los mecanismos involucrados en esta invasión están relacionados con la diferencia en el pronóstico de las localizaciones de CCE en perros y este parámetro no fue evaluado en este trabajo. Existen pocos estudios que se refieran a los mecanismos que utiliza el CCE para invadir. El mecanismo más estudiado en células epiteliales es la transición epitelio-mesénquima. No obstante, existen otros mecanismos de invasividad como migraciones en grupo y ayuda heteróloga entre células del estroma y grupos de células neoplásicas (Brabletz *et al.*, 2018), que merecen ser estudiados más adelante. Algunos de estos mecanismos podrían estar operando en el CCE canino y quizás podría estar más activo en las localizaciones más agresivas.

En resumen, este estudio permitió entregar información respecto de la actividad proliferativa y angiogénica del CCE cutáneo, digital y oral canino, en donde se encontró que no hay diferencias respecto de la expresión de las moléculas estudiadas entre las distintas localizaciones anatómicas mencionadas. Si consideramos que las neoplasias tienen un comportamiento biológico que está en estrecha relación con su microambiente tumoral, sería relevante examinar el resto de los componentes de este microambiente para esclarecer la o las posibles explicaciones biológicas que sustentan esta diferencia de malignidad según la localización anatómica.

7.1. Conclusiones

Los niveles de proliferación y de angiogénesis, evaluados según el perfil de moléculas de este estudio, no explican las diferencias en la agresividad de las distintas localizaciones del CCE canino.

8. REFERENCIAS

8.1. Bibliografía

- **AL-DISSI, A.; HAINES, D.; SINGH, B.; KIDNEY, B.** 2007. Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Associated with Tumor Cell Proliferation in Canine Cutaneous Squamous Cell Carcinomas and Trichoepitheliomas. *Vet Pathol.* 44: 823-830.

- **ALVAREZ, G.; PERRY, A.; TAN, B.; WANG, H.** 2006. Expression of epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the anal canal is independent of gen amplification. *Mod Pathol.* 19: 942-949.

- **BARCELLOS-HOFF, M.; LYDEN, D.; WANG, T.** 2013. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer.* 13(7): 511-518.

- **BELLUCO, S.; BRISEBARD, E.; WATRELOT, D.; PILLET, E.; MARCHAL, T.; PONCE, F.** 2013. Digital squamous cell carcinoma in dogs: epidemiological, histological, and immunohistochemical study. *Vet Pathol.* 50(6): 1078-1082.

- **BENCIVENGA, D.; CALDARELLI, I.; STAMPONE, E.; MANCINI, F.; BALESTRIERI, M.; DELLA RAGIONE, F.; BORRIELLO, A.** 2017. p27 kip1 and human cancer: A reappraisal of a still enigmatic protein. *Cancer Lett.* 403: 354-365.

- **BINDER, P.; MUTCH, D.** 2014. Update in prognostic markers for endometrial cancer. *Womens Health.* 10(3): 277-288.

- **BRABLETZ, T.; KALLURI, R.; NIETO, A.; WEINBERG, R.** 2018. EMT in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* 18(2): 128-134.

- **CARPENTER, L.; WITHROW, S.; POWER, B.; OGILVIE, G.** 1993. Squamous cell carcinoma of the tongue in 10 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 29:17-24.
- **CARVALHO, M.; GUIMARÃES, M.; PIRES, I.; PRADA, J.; SILVA-CARVALHO, R.; LOPES, C.; QUEIROGA, F.** 2013. EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours. *Res Vet Sci.* 95: 1094-1099.
- **DE PALMA, M.; BIZIATO, D.; PETROVA, T.** 2017. Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer.* 17(8): 457-474.
- **DICKINSON, P.; ROBERTS, B.; HIGGINS, R.; LEUTENEGGER, C.; BOLLEN, A.; KASS, P.; LECOUTEUR, R.** 2006. Expression of receptor tyrosine kinases VEGFR-1 (FLT-1), VEGFR-2 (KDR), EGFR-1, PDGFR α and c-Met in canine primary brain tumours. *Vet Comp Oncol.* 4(3): 132-140.
- **FELLER, L.; CHANDRAN, R.; KHAMMISSA, R.; MEYEROV, R.; LEMMER, J.** 2013. Alcohol and oral squamous cell carcinoma. *SADJ.* 68(4): 176-180.
- **FERRER, L.; FONDEVILA, D.; RABANAL, R.; VILAFRANCA, M.** 1995. Immunohistochemical detection of CD31 antigen in normal and neoplastic canine endothelial cells. *J Comp Path.* 112(4): 319-326.
- **FISCHER, A.; JACOBSON, K.; ROSE, J.; ZELLER, R.** 2008. Hematoxylin and Eosin staining of tissues and cell sections. *CSH Protocols.* 3(5): 1-2.
- **FISCHER, M.; UXA, S.; STANKO, C.; MAGIN, T.; ENGELANAD, K.** 2017. Human papilloma virus E7 oncoprotein abrogates the p53-p21-DREAM pathway. *Sci Rep.* 7(1): 2603.

- **FULTON, A.; NEMEC, A.; MURPHY, B.; KASS, P.; VERSTRAETE, F.** 2013. Risk factors associated with survival in dogs with nontonsillar oral squamous cell carcinoma: 31 cases (1990-2010). *J Am Vet Med Assoc.* 243(5): 696-702.

- **GOLDSCHMIDT, M.; SHOFER, F.** 1992. *Skin tumors of the dog and cat.* 1st Edition. Pergamon Press Ltd. New York, USA. Pp 37-50.

- **GOLDSCHMIDT, M.; KENNEDY, J.; KENNEDY, D.; YUAN, H.; HOLT, D.; CASAL, M.; TRAAS, A.; MAULDIN, E.; MOORE, P.; HENTHORN, P.; HARTNETT, B.; WEINBERG, K.; SCHLEGEL, R.; FELSBURG, P.** 2006. Severe papillomavirus infection progressing to metastatic squamous cell carcinoma in bone marrow-transplanted X-linked SCID dogs. *J Virol.* 80(13): 6621-6628.

- **GROSS, T.; IHRKE, P.; WALDER, E.; AFFOLTER, V.** 2005. *Skin diseases of the dog and cat: Clinical and histopathologic diagnosis.* 2nd Edition. Blackwell Science. Oxford, UK. Pp 581-589.

- **GRÖBE, A.; EICHHORN, W.; FRAEDERICH, M.; KLUWE, L.; VASHIST, Y.; WIKNER, J.; SMEETS, R.; SIMON, R.; SAUTER, G.; HEILAND, M.; BLESSMANN, M.** 2014. Immunohistochemical and FISH analysis of EGFR and its prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 43(3): 205-210.

- **HANAHAN, D.; WEINBERG, R.** 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144: 646-674.

- **HANAZONO, K.; FUKUMOTO, S.; KAWAMURA, Y.; ENDO, Y.; KADOSAWA, T.; IWANO, H.; UCHIDE, T.** 2015. Epidermal growth factor receptor expression in canine transitional cell carcinoma. *J. Vet. Med. Sci.* 77(1): 1-6.

- **HENRY, C.; BREWER, W.; WHITLEY, E.; TYLER, J.; OGILVIE, G.; NORRIS, A.; FOX, L.; MORRISON, W.; HAMMER, A.; VAIL, D.; BERG, J.** 2005. Canine digital tumors: A veterinary cooperative oncology group retrospective study of 64 dogs. *J Vet Intern Med.* 19: 720-724.

- **HENRY, C.; HIGGINBOTHAM, M.** 2010. Cancer management in small animal practice. 1st Edition. Elsevier. Philadelphia, USA. Pp 195-230; 299-332.

- **HOLZER, T.; FULFORD, D.; NEDDERMAN, D.; UMBERGER, T.; HOZAK, R.; JOSHI, A.; MELEMED, S.; BENJAMIN, L.; PLOWMAN, G.; SCHADE, A.; ACKERMANN, B.; KONRAD, R.; NASIR, A.** 2013. Tumor cell expression of vascular endothelial growth factor receptor 2 is an adverse prognostic factor in patients with squamous cell carcinoma of the lung. *PLoS One.* 8(11): e80292.

- **HONG, L.; HAN, Y.; ZHANG, H.; FAN, D.** 2015. Prognostic markers esophageal cancer: from basic research to clinical use. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 9(7): 887-889.

- **JIANG, D.; LI, X.; WANG, H.; SHI, Y.; XU, C.; LU, S.; HUANG, J.; XU, Y.; ZENG, H.; SU, J.; HOU, Y.; TAN, L.** 2015. The prognostic value of EGFR overexpression and amplification in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 15: 377.

- **KRUISWIJK, F.; LABUSCHAGNE, C.; VOUSDEN, K.** 2015. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(7): 393-405.

- **LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, D.** 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15(3): 178-196.

- **LANGE, C.; TOBLER, K.; ACKERMANN, M.; PANAKOVA, L.; THODAY, K.; FAVROT, C.** 2009. Three novel canine papillomaviruses support taxonomic clade formation. *J Gen Virol.* 90(11): 2615-2621.

- **LEMMON, M.; SCHLESSINGER, J.** 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Elsevier. USA. *Cell.* 141: 1117-1134.

- **LUFF, J.; ROWLAND, P.; MADER, M.; ORR, C.; YUAN, H.** 2016. Two canine papillomaviruses associated with metastatic squamous cell carcinoma in two related Basenji dogs. *Vet Pathol.* 53(6): 1160-1163.

- **MAIOLINO, P.; DE VICO, G.; RESTUCCI, B.** 2000. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell tumours and in squamous cell carcinomas of canine skin. *J. Comp. Path.* 123: 141-145.

- **MAIOLINO, P; PAPPARELLA, S.; RESTUCCI, B.; DE VICO, G.** 2001. Angiogenesis in squamous cell carcinomas of canine skin: An immunohistochemical and quantitative analysis. *J. Comp. Path.* 125: 117-121.

- **MAITI, GP.; MONDAL, P.; MUKHERJEE, N.; GHOSH, A.; GOSH, S.; DEY, S.; CHAKRABARTY, J.; ROY, A.; BISWAS, J.; ROYCHOUDHURY, S.; PANDA, CK.** 2013. Overexpression of EGFR in head and neck squamous cell carcinoma is associated with inactivation of SH3GL2 and CDC25A genes. *PLoS ONE* 8(5): e63440.

- **MATEO, F.; VIDAL-LALIENA, M.; CANELA, N.; BUSINO, L.; MARTINEZ-BALBAS, M.; PAGANO, M.; AGELL, N.; BACHS, O.** 2009. Degradation of cyclin A is regulated by acetylation. *Oncogene.* 28: 2654-2666.

- **MĂRGĂRITescu, C.; PIRICI, D.; SIMIONESCU, C.; MOGOANTĂ, L.; RAICA, M.; STÎNGĂ, A.; CIUREA, R.; STEPAN, A.; STÎNGĂ, AL.; RIBATTI, D.** 2009. VEGF and VEGFRs expression oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morph Embryol.* 50(4): 527-548.

- **MARTANO, RESTUCCI, B.; CECCARELLI, D.; LO MUZIO, L.; MAIOLINO, P.** 2016. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in canine oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 11(1): 399-404.

- **MASSANO, J.; REGATEIRO, F.; JANUÁRIO, G.; FERREIRA, A.** 2006. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 102:67-76.

- **MAZIÈRES, J.; BRUGGER, W.; CAPPUZZO, F.; MIDDEL, P.; FROSCHE, A.; BARA, I.; KLINGELSCHMITT, G.; KLUGHAMMER, B.** 2013. Evaluation of EGFR protein expression by immunohistochemistry using H-score and the magnification rule: Re-analysis of the SATURN study. *Lung Cancer.* 82(2): 231-237.

- **MESTRINHO, L.; FAÍSCA, P.; PELETEIRO, M.; NIZA, M.** 2014. PCNA and grade in 13 canine oral squamous cell carcinomas: association with prognosis. *Vet Comp Oncol.* 15(1): 18-24.

- **MEUTEN, D.** 2017. *Tumors in Domestic Animals.* 5th Edition. Willey-Blackwell. Iowa, USA. Pp: 97-99; 176-202.

- **MUNDAy, J.; DUNOWSKA, M.; LAURIE, R.; HILLS, S.** 2016. Genomic characterization of canine papillomavirus type 17, a possible rare cause of canine oral squamous cell carcinoma. *Vet. Microbiol.* 182: 135-140.

- **MILLANTA, F.; SILVESTRI, G.; VASELLI, C.; CITI, S.; PISANI, G.; LORENZI, D.; POLI, A.** 2006. The role of vascular endothelial growth factor and

its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci.* 81: 350-357.

- **NAGAMINE, E.; HIRAYAMA, K.; MATSUDA, K.; OKAMOTO, M.; OHMACHI, T.; UCHIDA, K.; KADOSAWA, T.; TANIYAMA, H.** 2017. Invasive front grading and epithelial-mesenchymal transition in canine oral and cutaneous squamous cell carcinomas. *Vet. Pathol.* 54(5): 783-791.
- **NEMEC, A.; MURPHY, B.; KASS, P.; VERTRAETE, F.** 2012. Histological subtypes of oral non-tonsillar squamous cell carcinoma in dogs. *J. Comp. Path.* 147: 111-120.
- **NIETO, M., HUANG, R.; JACKSON, R.; THIERY, J.** 2016. *EMT: 2016.* *Cell.* 166(1): 21-45.
- **NIKULA, K.; BENJAMIN, S.; ANGLETON, G.; SAUNDER, W.; LEE, A.** 1992. Ultraviolet radiation, solar dermatosis, and cutaneous neoplasia in Beagle dogs. *Radiat Res.* 129(1): 11-18.
- **NORTH, S.; BANKS, T.** 2009. *Small animal oncology: An introduction.* 1st Edition. Elsevier. Philadelphia, USA. Pp 94-96; 173-175.
- **PEÑA, L.; NIETO, A.; PÉREZ-ALENZA, D.; CUESTA, P.; CASTAÑO, M.** 1998. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest.* 10(3): 237-246.
- **PICKERING, C.; ZHOU, J.; LEE, J.; DRUMMOND, J.; PENG, A.; SAADE, R.; TSAI, K.; CURRY, J.; TETZLAFF, M.; LAI, S.; YU, J.; MUZNY, D.; DODDAPANENI, H.; SHINBROT, E.; COVINGTON, K.; ZHANG, J.; SETH, S.; CAULIN, C.; CLAYMAN, G.; EL-NAGGAR, A.; GIBBS, R.; WEBER, R.;**

- MYERS, J.; WHEELER, D.; FREDERICK, M.** 2014. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 20(24): 6582-6592.
- **PREHN, R.; PREHN, L.** 2013. A new kink in an old theory of carcinogenesis. *Theor Biol Med Model.* 10: 12.
 - **QUAIL, D.; JOYCE, J.** 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med.* 19(11): 1423-1437.
 - **REBAY, I.** 2001. Keeping the receptor tyrosine kinase signaling pathway in check: lesson from *Drosophila*. *Dev. Biol.* 251(1): 1-17.
 - **SABATTINI, S.; MANCINI, F.; MARCONATO, L.; BACCI, B.; ROSSI, F.; VIGNOLI, M.; BETTINI, G.** 2014. EGFR overexpression in canine primary lung cancer: pathogenic implications and impact on survival. *Vet Comp Oncol.* 12(3): 237-248.
 - **SEIZBERG, E.; POTENTA, S.; XIE, L.; ZEISBERG, M.; KALLURI, R.** 2007. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res.* 67(21): 10123-10128.
 - **SHEN, Y.; STANISLAUSKAS, M.; LI, G.; ZHENG, D.; LIU, L.** 2017. Epigenetic and genetic dissections of UV-induced global gen dysregulation in skin cells through multi-omics analyses. *Sci Rep.* 7: 42646.
 - **SHIVAMALLAPPA, S.; VENKATRAMAN, N.; MOHANTY, L.; SHENOY, S.** 2011. Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. *Int J Oral Sci.* 3: 216-224.
 - **STÎNGĂ, A.C.; MĂRGĂRITescu, O.; STÎNGĂ A.S.; PIRICI, D.; CIUREA, R.; BUNGET, A.; CRUCE, M.** 2011. VEGFR1 and VEGFR2

immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: a morphometric study. *Rom J Morphol Embryol.* 52(4): 1269-1275.

- **SØLAND, T.; BRUSEVOLD, I.** Prognostic molecular markers in cancer – Quo vadis? *Histopathology.* 63(3): 297-308.
- **TERRAGNI, R.; CASADEI, A.; SABATTINI, S.; BETTINI, J.; AMADORI, D.; TALAMONTI, C.; VIGNOLI, M.; CAPELLI, L.; SAUNDERS, J.; RICCI, M.; ULIVI, P.** 2014. EGFR, HER-2 and KRAS in canine gastric epithelial tumors: A potential human model? *PLoS ONE.* 9(1): e85388.
- **THOMPSON, J.; MORRISON, J.; PEARL, D.; BOSTON, S.; WOOD, G.; FOSTER, R.; COOMBER, B.** 2015. Receptor tyrosine kinase expression profiles in canine cutaneous and subcutaneous mast cell tumors. *Vet Pathol.* 53(3): 545-558.
- **TYLOR, C.; RUDBECK, L.** 2013. *Immunohistochemical staining methods.* 6th Edition. Dako Corporation. Glostrup, Denmark. Pp 1-218.
- **VENUTI, A.; PAOLINI, F.; NASIR, L.; CORTEGGIO, A.; ROPERTO, S.; CAMPO, M.; BORZACCHIELLO, G.** 2011. Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. *Molecular Cancer.* 10:140.
- **WEI, J.; KOK, L.; BYRNE, S.; HALLIDAY, G.** 2015. Photodamage: All signs lead to actinic keratosis and early squamous cell carcinoma. *Curr Probl Dermatol.* 46: 14-19.
- **WHITESIDE, T.** 2008. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 27: 5404-5412.
- **WITHROW, S.; VAIL, D.; PAGE, R.** 2013. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 5th Edition. Elsevier Saunders. Missouri, USA. Pp 305-317.

- **WOLFESBERGER, B.; GUIJA DE ARES PACOHAGA, A.; WILLMANN, M.; GERNER, W.; MILLER, I.; SCHWENDENWEIN, I.; KLEITER, M.; EGERBACHER, M.; THALHAMMER, J.; MUELLAUER, L.; SKALICKY, M.; WALTER, I.** 2007. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in canine lymphoma. *J Comp Path.* 137: 30-40.

- **XIA, X.; DU, R.; ZHAO, L.; SUN, W.; WANG, X.** 2014. Expression of AEG-1 and microvessel density correlates with metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Hum Pathol.* 45(4): 858-865.

- **ZACCHETTI, A.; VAN GARDEREN, E.; TESKE, E.; NEDERBRAGT, H.; DIERENDONCK, J.; RUTTEMAN, G.** 2003. Validation of the use of proliferation markers in canine neoplastic and non-neoplastic tissues: Comparison of Ki-67 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression versus in vivo bromodeoxyuridine labelling by immunohistochemistry. *APMIS.* 111(3): 430-438.

- **ZACHARY, J.** 2017. *Pathologic basis of veterinary disease.* 6th Edition. Elsevier Mosby. Missouri, USA. Pp 286-321.

- **ZWICK, E.; BANGE, J.; ULLRICH, A.** 2001. Receptor tyrosine kinase signaling as a target for cancer intervention strategies. *Endocr Relat Cancer.* 8: 161-173

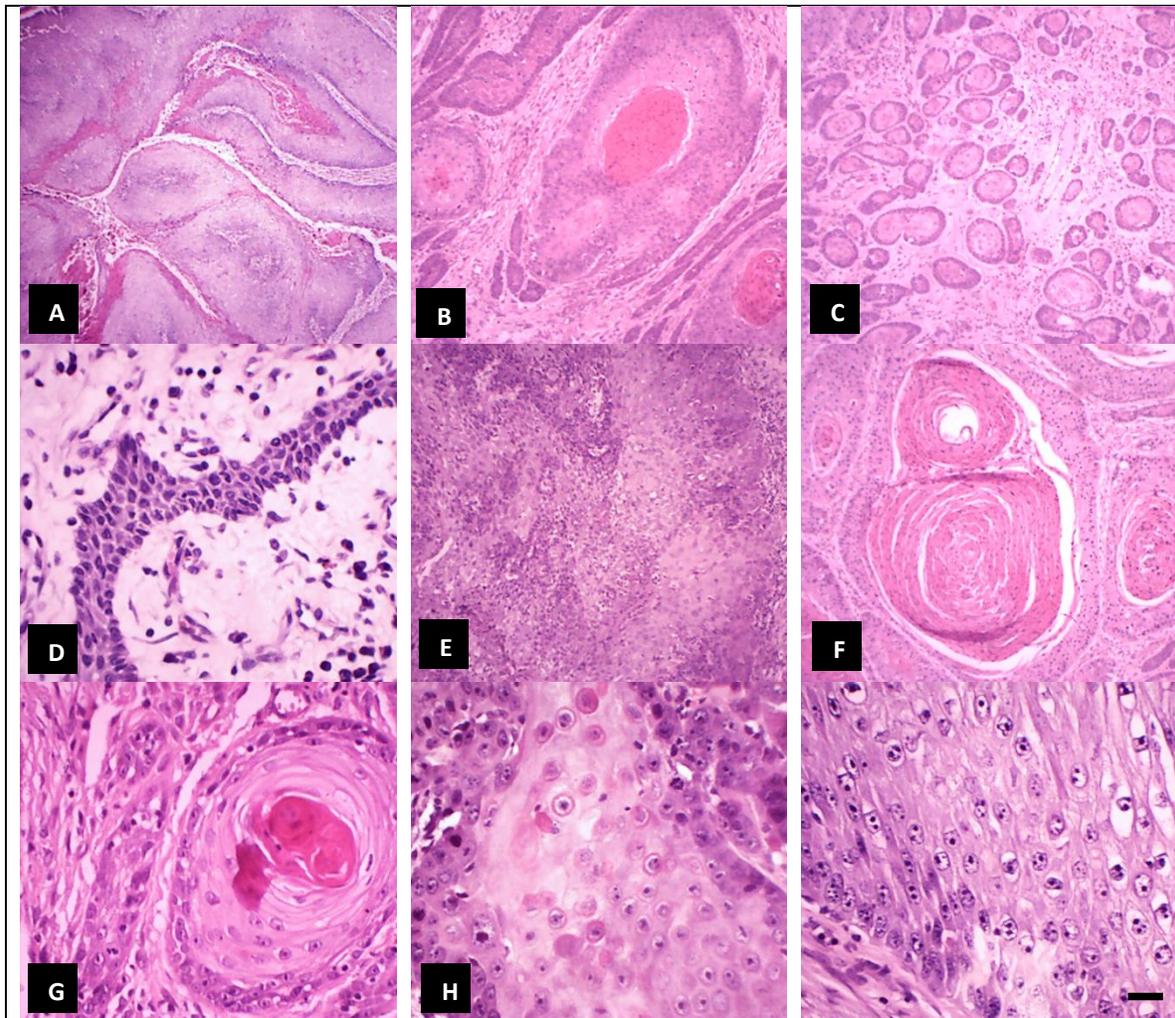
9. ANEXOS

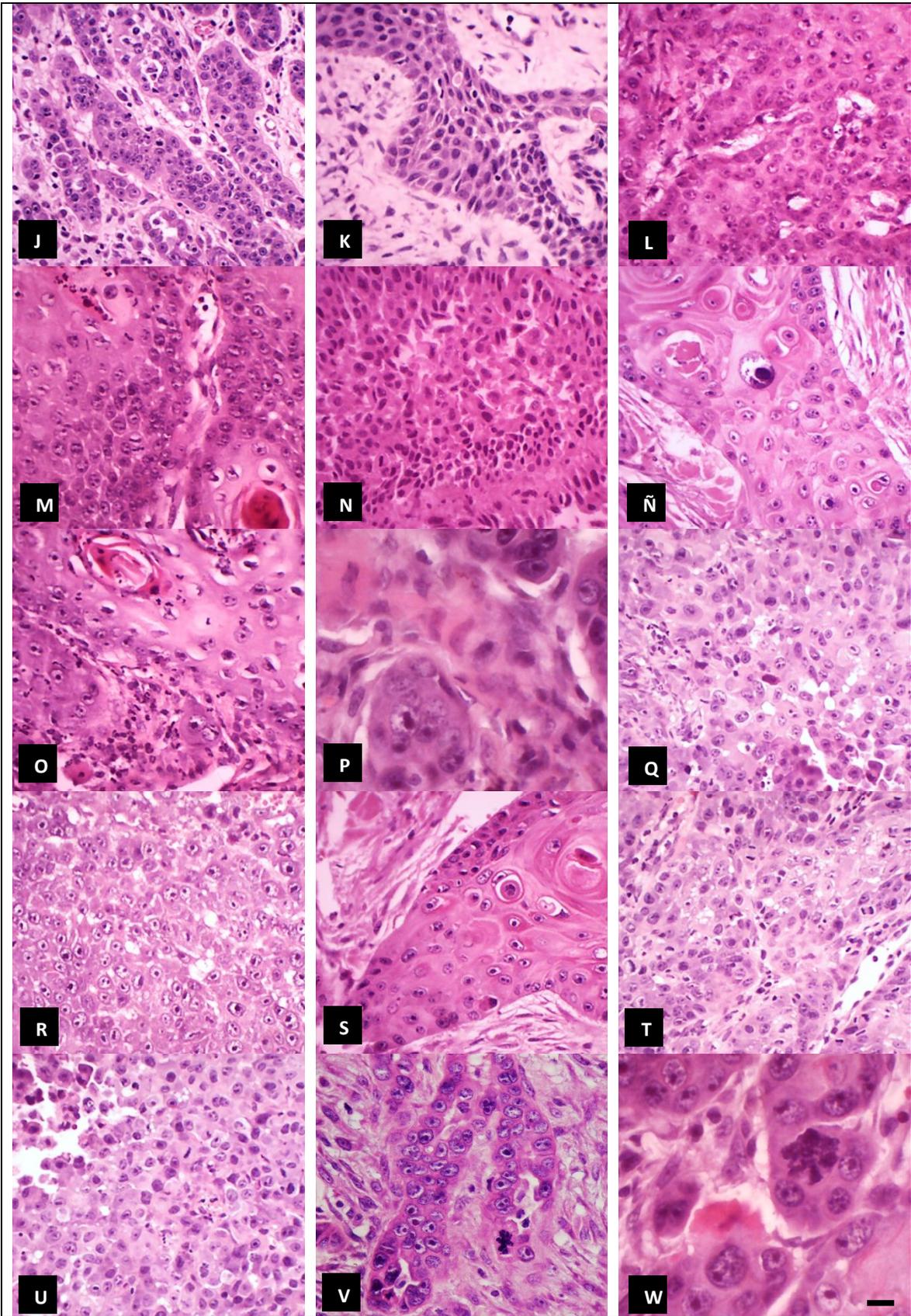
Anexo 1. Glosario de las características del CCE

- **Anisocariosis leve:** El tamaño nuclear varía entre 1-2 veces el tamaño.
- **Anisocariosis moderada:** El tamaño nuclear varía entre 3-4 veces el tamaño.
- **Anisocariosis alta:** El tamaño nuclear varía > 4 veces el tamaño.
- **Células disqueratóticas:** Células que presentan queratinización incompleta en su citoplasma, observada como hipereosinofilia.
- **Células multinucleadas:** Células que presentan más de un núcleo.
- **Cordones:** Estructuras neoplásicas alargadas delgadas, formadas por decenas de células de espesor.
- **Grupos:** Estructuras neoplásicas ovoides pequeñas, formadas por decenas de células.
- **Islas:** Estructuras neoplásicas ovoides grandes, formadas por miles de células.
- **Mantos:** Estructuras neoplásicas irregulares, formadas por miles de células.
- **Mitosis atípicas:** Mitosis que no tienen la estructura del prototipo de cada fase, como formas de asteriscos, ovillos, etc.
- **Mitosis típicas:** Mitosis que tienen la estructura del prototipo de cada fase.
- **Nidos:** Estructuras neoplásicas ovoides medianas, formadas por cientos de células.
- **Núcleo eucromático:** Núcleo que presenta cromatina homogénea con basofilia leve, sin espacios visibles.
- **Núcleo heterocromático o heterogéneo:** Núcleo que presenta aglomeraciones finas o gruesas de su cromatina.
- **Núcleo hipercromático:** Núcleo que presenta cromatina con basofilia intensa, sin espacios visibles.
- **Núcleo vesiculado:** Núcleo que presenta marginación de su cromatina.
- **Nucléolos grandes:** Nucléolos que ocupan > del 50% del núcleo.
- **Nucléolos medianos:** Nucléolos que ocupan entre 20-50% del núcleo.
- **Nucléolos pequeños:** Nucléolos que ocupan < del 20% del núcleo.
- **Núcleos gigantes:** Núcleos que presentan más de 6 veces el tamaño del resto.

- **Núcleos raros:** Núcleos que presentan anomalías en su forma, como lobulaciones, patrones de cromatina irregulares, entre otros.
- **Queratinización moderada:** Pequeños anillos concéntricos de queratina dentro de las estructuras antes mencionadas.
- **Queratinización alta:** Grandes anillos concéntricos de queratina dentro de las estructuras antes mencionadas.
- **Trabéculas:** Estructuras neoplásicas alargadas gruesas, ocasionalmente coalescentes, formadas por cientos de células de espesor.

Anexo 2. Figuras de las características histológicas del CCE.





A. Trabéculas. **B.** Islas. **C.** Nidos y grupos. **D.** Cordones. **E.** Manto. **F.** Queratinización alta. **G.** Queratinización moderada. **H.** Células disqueratóticas. **I.** Núcleos vesiculados. **J.** Núcleos hetercromáticos o heterogéneos. **K.** Núcleos eucromáticos e hipercromáticos. **L.** Anisocariosis leve. **M.** Anisocariosis moderada. **N.** Anisocariosis elevada. **Ñ.** Célula gigante. **O.** Célula binucleada. **P.** Células multinucleadas. **Q.** Nucléolos pequeños. **R.** Nucléolos medianos. **S.** Nucléolos grandes. **T.** Mitosis típicas en metafase. **U.** Mitosis típicas en metafase. **V.** Mitosis atípica con forma de asterisco. **W.** Mitosis atípica con forma de asterisco. **Barras.** **A.** 250 μm . **B-C, E-F.** 100 μm . **D, G-O, Q-V.** 20 μm . **P, W.** 10 μm . **Tinción.** H&E.