



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD PROLIFERATIVA
Y DE APOPTOSIS CELULAR SEGÚN GRADO
HISTOPATOLÓGICO EN MASTOCITOMA
CUTÁNEO CANINO

CATARINA EUGENIA CASTILLO LAZO

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Cs. Biológicas.

Profesor Guía: Dra. Raquel Cepeda.
Proyecto FIV 4602004.

Santiago – Chile
2008



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

COMPARACIÓN DE ACTIVIDAD PROLIFERATIVA Y DE APOPTOSIS CELULAR SEGÚN GRADO HISTOPATOLÓGICO EN MASTOCITOMA CUTÁNEO CANINO

CATARINA EUGENIA CASTILLO LAZO

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Cs. Biológicas.

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : RAQUEL CEPEDA
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ADARMES
PROFESOR CONSEJERO: VICTOR TOLEDO

SANTIAGO, CHILE
2008

DEDICATORIA

A mis padres Regina y Ernesto por su amor y por su incansable
e incondicional apoyo.

A Rodrigo Brañes C. mi compañero, mi colega, mi amigo y sobre todo
mi fuerza para seguir adelante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Informe de aprobación	2
Dedicatoria	3
Resumen	4
Summary	6
I. Introducción	8
II. Revisión Bibliográfica	
Mastocitoma cutáneo canino	9
Presentación Clínica	9
Características morfológicas de los mastocitos	12
Diagnóstico	14
Tratamiento	16
Pronóstico	17
III. Objetivos	31
IV. Material y Método	32
V. Resultados	
Obtención de muestras	35
Confirmación diagnóstica	36
Características histopatológicas del mastocitoma cutáneo canino	37
Morfometría	39
Proliferación celular	41
Apoptosis	43
Correlaciones	45

VI. Discusión	46
VII. Conclusiones	49
VIII. Bibliografía	51
Anexos	
Metacromasia	56
Apoptosis celular	57
Proliferación celular	58

RESUMEN

Se utilizaron 59 biopsias de mastocitoma cutáneo (MCT), provenientes de caninos entre 2 a 15 años de edad, sin distinción de sexo ni raza, procedentes de casos de archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en el período comprendido entre los años 2004-2005. De cada biopsia se obtuvieron muestras de 4 µm de grosor para efectuar las técnicas histológicas en microscopía óptica.

Las características histopatológicas de las muestras de MCT y su grado de diferenciación se determinaron con la ayuda de 2 tinciones: i) hematoxilina - eosina (H/E) y ii) azul de toluidina (A/T) (metacromasia). Con esta última, además, fue posible determinar el área citoplasmática promedio, con gránulos de reacción metacromática para cada grado de diferenciación neoplásica.

Se analizó la actividad proliferativa y apoptótica en los 3 grados del MCT mediante la detección inmunohistoquímica del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y a través del método TUNEL respectivamente.

De acuerdo a las características histopatológicas observadas en las muestras teñidas con H/E se mantuvo la clasificación original, ya que concordaron con los criterios de la clasificación descrita por Patnaik *et al.* (1984). La técnica de metacromasia permitió reconocer los gránulos metacromáticos característicos de los mastocitos diferenciados y confirmar el diagnóstico inicial en las biopsias GI, GIII y 21 tumores GII. Los restantes MCT GII (23) fueron reclasificados hacia el GI y GIII.

En la medición de área metacromática los resultados obtenidos mostraron un valor promedio que disminuía hacia el MCT GIII con diferencias estadísticamente significativas presentes sólo entre el GIII y los otros grados ($p \leq 0,05$).

Los resultados obtenidos con PCNA mostraron un área promedio inmunomarcada que aumentaba hacia el MCT GIII. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$).

Mediante el método TUNEL, los resultados revelaron que el promedio de área inmunomarcada fue menor en MCT GI y aumentó hacia el GII y GIII. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$).

Los hallazgos evidencian una concordancia entre el grado de malignidad tumoral y el incremento de la población de células neoplásicas en proliferación que supera a las células apoptóticas, así como también, demuestran el menor grado de diferenciación celular a través de la pérdida de gránulos metacromáticos de los mastocitos en el MCT GIII, corroborando el hecho de que en esta neoplasia, están alteradas ambas vías, la proliferativa y la apoptótica.

SUMMARY

59 biopsies of cutaneous canine mast cell tumors (MCT) were used, coming from dogs of 2 to 15 years of age, without distinction of sex or breed, coming from archive cases of the Veterinary Pathology of the University of Chile, collected from 2004 to 2005. From each biopsy samples of 4 µm thick were obtained and processed according histological technics for light microscopy.

The morphological characteristics of the MCT and the differentiation degree were determined by using two stains: i) hematoxiline-eosine (H/E) and ii) toluidine blue (T/B) (metachromasia). With T/B, was possible to determine the average cytoplasmatic area with metachromatic granules for in each tumor differentiation degree.

The proliferative and apoptotic activity was analyzed for the 3 degrees of MCT by means of the immunohistochemical detection of the of proliferation cell nuclear antigen (PCNA) and through the TUNNEL method, respectively.

According to the histopathological characteristic observed in samples stained with H/E the original classification was maintained, since the results agreed with the classification described by Patnaik et al. (1984). The T/B metachromatic technique allowed to recognize the characteristic metachromatic granules of differentiated mast cells and to confirm the initial classification in all biopsies GI and GIII and in 21 GII tumors. The remaining MCT GII (23) were reclassified as GI or GIII.

In the measurement of the metachromatic area the results obtained showed an average value that decreased from MCT GI to GIII with differences statistically significant only when GIII was compared with the other degrees ($p \leq 0,05$).

Although, the results obtained with PCNA showed an average immunostained area that increased from GI to GIII, these differences were not statistically significant among the different degrees ($p > 0,05$).

The results obtained with the TUNNEL method, revealed that the average immunostained area increased from MCT GI to GII and GIII. These differences were not however, statistically significant among the different degrees ($p > 0,05$).

The results show an agreement between the degree of tumoral malignancy and the increment in proliferation of the neoplastic cell population that overcomes cell apoptosis, corroborating the fact that in this neoplasia, both events, cell proliferation and apoptosis are altered. Also, they showed that the loss of cell differentiation correlates with the loss of mast cell metachromatic granules.

1. INTRODUCCIÓN

La oncología veterinaria ha presentado un gran desarrollo durante los últimos años, principalmente, en el campo de la medicina de pequeños animales, siendo su principal objetivo, el lograr la remisión de la masa tumoral y mejorar la calidad de vida del paciente.

Para esto es fundamental contar con un sistema de diagnóstico confiable y de factores pronósticos que permitan una mejor evaluación del caso oncológico.

Dentro de las neoplasias de piel del canino, una de las más comunes es el Mastocitoma, constituyendo entre un 7-21% de los tumores cutáneos caninos y un 6% del total de tumores (Simoes *et al.*, 1994; Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

Histológicamente, se distinguen tres grados de mastocitoma cutáneo canino o tumor de células mastocíticas (MCT) en función del nivel de diferenciación celular, criterios histológicos de malignidad y características del estroma, con una alta correlación con pronóstico y supervivencia: grado I (GI) o bien diferenciado (30-55% de los casos); grado II (GII) o intermedio (25-45%) y grado III (GIII) o poco diferenciado (anaplásico) (20-40%) (Patnaik *et al.*, 1984). Los tumores más anaplásicos presentan células con un escaso número de granulaciones, observándose claramente los criterios citológicos de malignidad (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

Otros factores que han sido informados como de valor pronóstico para neoplasias incluyen: estadificación clínica, regiones de organización nucleolar argirofílicas (AgNORs), antígenos de proliferación celular (PCNA y Ki67) y actividad apoptótica.

En este trabajo se propone estudiar la relación entre los grados de diferenciación histopatológicos del mastocitoma cutáneo canino con la expresión de proteína PCNA de proliferación celular y la actividad apoptótica mediante el método TUNEL.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Mastocitoma Cutáneo Canino (MCT)

Presentación Clínica

Si bien la consulta suele girar en torno a una masa cutánea visible, el paciente puede tener manifestaciones sistémicas relacionadas con los mediadores biológicos liberados que provocan, en algunas ocasiones, un cuadro más grave que la presencia del propio tumor. Estos signos pueden variar desde un retardo en la cicatrización de heridas hasta un shock hipotensivo (Lemarié *et al.*, 1996; Gieger, 2004).

Se ha diagnosticado en perros de edad media o avanzada (8.5 años promedio), aunque puede aparecer en animales más jóvenes (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003; Strefezzi *et al.*, 2003). No se describe predilección sexual y puede aparecer en cualquier raza, pero las más susceptibles son: Boxer, Boston terrier, Bull terrier, Bullmastiff, Bulldog, Setter Inglés, Labrador, Golden Retriever, Teckel, Weimaraner, Cocker Spaniel, Schnauzer y Sharpei (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003; Strefezzi *et al.*, 2003).

Se ubican frecuentemente en piel y la afección visceral puede suceder como lesión metastásica. El mastocitoma visceral primario (mastocitosis sistémica) es raro y sólo aparece en fases terminales (Lemarié *et al.*, 1996).

El MCT se localiza, principalmente, en la piel de tronco y región perineal (en un 50% de los casos), 40% en las extremidades y 10% en cabeza y cuello. Un 10 a 15% de los casos son múltiples (London *et al.*, 2003). En ciertas razas de alto riesgo se reconocen puntos predilectos como miembros pélvicos y sitios cutáneos múltiples en Boxer y Pug (Lemarié *et al.*, 1996).

En general, la apariencia física no permite establecer su grado de malignidad ni definir su evolución. Algunos se mantienen estables durante meses o años antes de desarrollarse con extrema rapidez, pero en otras ocasiones se comportan de forma agresiva desde el principio como los tumores de cavidad oral (Kitchell, 2000; London *et al.*, 2003; Gieger, 2004).

El cuadro clínico varía pudiendo comprometer tanto subcutáneo como dermis, aunque la forma más frecuente de presentación es la aparición de nódulos intradérmicos, de consistencia firme y tamaño variable (1-10 cm). Pueden aparecer encapsulados y bien circunscritos o infiltrar el tejido subcutáneo e incluso alcanzar la capa muscular. La superficie tumoral puede estar ulcerada o eritematosa (London *et al.*, 2003; Gieger, 2004) y a veces existe un historial previo de prurito; con frecuencia la zona esta alopecica y en los tejidos adyacentes aparece eritema y/o edema. En esta forma intradérmica, el mastocitoma puede adoptar con menos frecuencia forma de placa no encapsulada y pobremente demarcada con ulceración, eritema, edema e inflamación. Las masas observadas pueden variar de tamaño como consecuencia del edema local y la inflamación producida por la liberación de histamina y enzimas proteolíticas (London *et al.*, 2003; Gieger, 2004).

Basándose en el tiempo de sobrevida, índice de recurrencia y metástasis, la variante subcutánea del mastocitoma tendría un comportamiento menos agresivo y, por tanto, mejor pronóstico que el MCT GIII y compartiría características con el grado intermedio de diferenciación (Newman *et al.*, 2007).

La manipulación mecánica del MCT durante el examen físico y la toma de muestras, puede provocar la degranulación masiva de mastocitos, lo que supone una rápida inflamación de la zona y la aparición de eritema. Esta evolución, denominada *signo de Darier*, puede llegar a ser muy manifiesta y provocar nerviosismo, tanto en el clínico, como

en el propietario y su aparición tiene una importante significación diagnóstica (London *et al.*, 2003; Gieger, 2004).

Las principales manifestaciones clínicas asociadas son 3:

1) Aparición de úlceras gastroduodenales: los mastocitos cancerosos contienen 25-50 veces más histamina que los normales, una característica central en la morbilidad asociada con la enfermedad (Lemarié *et al.*, 1996; Ozaki *et al.*, 2002; London *et al.*, 2003). Su concentración en plasma se ha relacionado con progresión de la enfermedad (Ishiguro *et al.*, 2003).

2) Coagulopatías ocasionales: como resultado de la heparina liberada por los mastocitos.

3) Retraso en los procesos de cicatrización postablación quirúrgica: debido al incremento de enzimas proteolíticas y aminas vasoactivas relacionadas con el mastocitoma (Lemarié *et al.*, 1996).

Otras manifestaciones de relevancia clínica son la presencia de eosinófilos en la masa tumoral y shock hipotensivo en casos extremos (Lemarié *et al.*, 1996).

La capacidad metastásica depende, en primera instancia, del grado histológico del tumor. El 76% de los casos metastiza a órganos y/o distintos tejidos, tales como: linfonodos regionales (76%), bazo (46%), hígado (41%), riñón o corazón (London, 2003; Gieger, 2004).

La etiopatogénesis del MCT en caninos es desconocida, así como la razón de su alta incidencia en esta especie. Aunque algunos estudios han sugerido la posibilidad de una causa viral donde el mastocitoma ha sido transmitido desde perros con tumores sólidos a perros susceptibles en el laboratorio, usando un extracto del tejido tumoral, no hay evidencia epidemiológica que indique una transmisión horizontal de este tumor (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

Dado que la mayoría de los MCT residen en piel, se ha sugerido que carcinógenos tópicos podrían jugar un rol en esta enfermedad (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003). No existen reportes que indiquen cuál es la causa, ni tampoco existe una distribución regional particular de estos tumores. El aumento de su incidencia en ciertas razas sugiere la posibilidad de una causa genética desconocida (London *et al.*, 2003).

Distintos autores han identificado la presencia de mutaciones activas en el proto-oncogen *c-kit* del MCT. Este gen codifica al receptor del *stem cell factor* (*Kit*) y la interacción entre ambos, permite la diferenciación, supervivencia y función de los mastocitos. La alta frecuencia de mutaciones, sugiere que aberraciones en *c-kit* podrían estar involucradas en el desarrollo o progresión del MCT (London *et al.*, 2003).

Características morfológicas de los mastocitos

Los mastocitos son células redondas que poseen un núcleo redondo a oval, caracterizados por contener aproximadamente 1000 gránulos citoplasmáticos metacromáticos que pueden teñirse con colorantes como azul de toluidina, giemsa y azul de metileno. La metacromasia se refiere a un cambio de color del azul al rojo a través del violeta que aparece cuando los cortes se tiñen en soluciones acuosas diluídas de colorantes del grupo tiazina, tal como el azul de toluidina (A/T), debido a la combinación de estos colorantes con ésteres sulfato presentes en las glicoproteínas sulfatadas de los gránulos como la heparina (tetrasacárido esterificado con 5 grupos sulfato) (London *et al.*, 2003).

Los mastocitos derivan de células precursoras presentes en médula ósea y desde ésta migran a diferentes tejidos donde completan su maduración. Distintas citoquinas son importantes en el desarrollo y maduración de mastocitos, incluyendo IL-3, IL-4, IL-6 y *stem cell factor* (SCF) entre otras (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

El microambiente del tejido local donde los mastocitos maduran, determina la capacidad funcional de estas células, aunque experimentos en ratas sugieren que las características funcionales de los mastocitos no son fijas, porque el contenido de los gránulos varía si son llevados de un ambiente a otro. Este cambio sería regulado por las citoquinas del ambiente local (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

En el perro, existen 3 subtipos de mastocitos de acuerdo al contenido enzimático presente en sus gránulos: *i*) aquellos que contienen sólo triptasa, *ii*) mastocitos que contienen sólo quimasa y *iii*) los que contienen a ambas, este último grupo es el más frecuente en piel (Fernández *et al.*, 2005).

El subtipo de mastocito involucrado en el desarrollo del MCT aún no ha sido dilucidado, aunque se han encontrado mastocitos conteniendo triptasa y quimasa (Fernández *et al.*, 2005).

En la superficie celular del mastocito hay receptores específicos para IgE y para componentes del complemento (C5a), que les permite participar en reacciones de fase aguda, como también, en reacciones inflamatorias o inmunológicas más persistentes o incluso crónicas (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

Los mastocitos son activados a través de la unión entre el receptor de alta afinidad e IgE lo que permite la liberación y producción de varios mediadores y compuestos biológicamente activos, tales como:

- Histamina, heparina, condroitin sulfato y proteasas;
- Mediadores lipídicos, como prostaglandinas, leucotrienos y factor activador plaquetario (PAF);
- Citoquinas, como factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6 (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003; Misdorp, 2004).

Estos mediadores permiten diversas reacciones, incluyendo un incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, espasmo muscular, prurito, anticoagulación y activación de eosinófilos y neutrófilos. Colectivamente, estos efectos pueden generar una reacción de hipersensibilidad local y, más aún, una hipersensibilidad sistémica (shock anafiláctico) (London *et al.*, 2003).

Diagnóstico

El diagnóstico se basa en los hallazgos de la anamnesis, examen clínico, citología e histopatología (Lemarié *et al.*, 1996).

El estudio citológico a través de un aspirado con aguja fina proporciona un diagnóstico rápido y permite estimar el grado de diferenciación celular. No obstante, siempre es necesario realizar una biopsia para confirmar el diagnóstico, definir el grado histológico y evaluar el compromiso de los bordes quirúrgicos (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

El diagnóstico diferencial debe incluir otros tumores de células redondas como linfoma, plasmocitoma, histiocitoma, melanoma amelanótico y tumor venéreo transmisible (TVT) (London *et al.*, 2003).

La clasificación histopatológica descrita por Patnaik *et al.* (1984), define 3 grados de mastocitoma: a) grado I (GI) o bien diferenciado, células con límites citoplasmáticos bien definidos y núcleos regulares, esféricos u ovoides, figuras mitóticas raras y homogeneidad celular, gránulos citoplasmáticos grandes y de tinción intensa; b) grado II (GII) o intermedio, células agrupadas con límites citoplasmáticos indefinidos, proporción núcleo/célula menor que en GI, figuras mitóticas infrecuentes, núcleos irregulares y pleomorfismo celular; c) grado III (GIII) o anaplásico, hiper celularidad con límites

citoplasmáticos indefinidos, núcleos de tamaño y forma irregular, figuras mitóticas frecuentes con elevado pleomorfismo celular y disminución de gránulos citoplasmáticos.

Esa clasificación tiene un valor limitado al momento de clasificar MCT GII ya que corresponde a un grupo amplio y heterogéneo, con grandes diferencias en el comportamiento y aspecto físico tumoral. Además, manifiesta grandes diferencias en los índices de supervivencia del paciente (Maiolino *et al*, 2005; Northrup *et al.*, 2005; Scase *et al.*, 2006).

Por otro lado, se debe clasificar el tumor según la estadificación clínica establecida por la OMS, que define 4 estadios clínicos del MCT en función de la localización y extensión del proceso: 0) tumor solitario que no involucra toda la dermis; 1) tumor solitario confinado a la dermis, sin compromiso linfonodular; 2) tumor solitario confinado a la dermis, con compromiso del linfonodo regional; 3) múltiples tumores en dermis o una gran masa infiltrativa, con o sin compromiso del linfonodo regional y 4) cualquier tumor con metástasis a distancia o recurrencia con metástasis con o sin signos de enfermedad sistémica (Jaffe *et al.*, 2000; London *et al.*, 2003).

Finalmente, se debe complementar el diagnóstico con los siguientes exámenes: evaluación de linfonodos regionales, radiografía/ecografía, frotis de capa leucocitaria (flogística), aspiración medular, hemograma completo, perfil químico, urianálisis y detección de sangre oculta fecal (Lemarié *et al.*, 1996; London *et al.*, 2003).

Tratamiento

El tratamiento de elección en masas solitarias bien delimitadas es la cirugía, que se realiza con amplios márgenes en cada dirección, con al menos la eliminación de un plano facial por debajo del tumor, e incluye el linfonodo regional si se sospecha metástasis (Frimberger *et al.*, 1997; Fox, 1998; London *et al.*, 2003; Misdorp, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Fulcher *et al.*, 2006).

Con cirugías conservadoras más del 50% de los MCT recidivan, incluso con cirugías agresivas el índice de recurrencia alcanza el 30% de los casos (Lemarié *et al.*, 1996). La mayoría se presenta dentro de los primeros 4 meses posteriores a la cirugía y la sobrevida en estos pacientes es de hasta 6 meses (Simoes *et al.*, 1994). Se recomienda evaluar por citología los márgenes quirúrgicos para reintervenir si muestran infiltración (Rogers, 1996; Murphy *et al.*, 2004; Séguin *et al.*, 2006).

No sería necesario realizar un tratamiento adicional local después de una completa resección en MCT GII y la mayoría de estos tumores no requiere tampoco tratamiento sistémico (Séguin *et al.*, 2001; Weisse *et al.*, 2002). Si la remoción de MCT GI y II es incompleta o no fuera posible, se sugiere el uso de radioterapia adicional (Frimberger *et al.*, 1997; London *et al.*, 2003; Séguin *et al.*, 2006). También se recomienda en MCT GIII en conjunto o no con quimioterapia (Fox, 1998; Chaffin *et al.*, 2002; London *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 2004).

En MCT múltiples, con metástasis a distancia, mastocitosis sistémica, tumores no operables o tumores anaplásicos una vez extirpados, está recomendado el empleo de quimioterapia sistémica (Frimberger *et al.*, 1997; Gerritsen *et al.*, 1998; Thamm *et al.*, 1999; London *et al.*, 2003).

La mayoría de los pacientes manifiesta una respuesta positiva inicial, pero los

tiempos de remisión suelen ser muy cortos, por ello independiente del protocolo antineoplásico elegido, se recomienda el uso de tratamiento sintomático (Rogers, 1996; London *et al.*, 2003).

Pronóstico

El pronóstico depende de múltiples factores, pero el más importante es el grado histológico (Frimberger *et al.*, 1997; Sfiligoi *et al.*, 2005) ya que se correlaciona con el tiempo de supervivencia del animal (Patnaik *et al.*, 1984; Gerritsen *et al.*, 1998; Jaffe *et al.*, 2000; London *et al.*, 2003; Preziosi *et al.*, 2004). Los tumores más anaplásicos tienen un mayor potencial metastático y una mayor tendencia a diseminarse produciendo mastocitosis sistémica que los de GI o GII; mientras que los MCT GI tienen un tiempo de supervivencia dos veces mayor que los de GII y seis veces mayor que los de GIII (Patnaik *et al.*, 1984). Los MCT GII han reportado un tiempo de supervivencia mayor que los de GIII después de la excisión quirúrgica (London *et al.*, 2003).

Los otros factores que influyen en el pronóstico son:

- Raza: los perros Boxer tienen alta incidencia de MCT, pero tienden a ser bien diferenciados y tener mejor pronóstico (London *et al.*, 2003; Misdorp, 2004).
- Localización del tumor: tumores localizados en cavidad oral, región perineal, inguinal, escrotal y prepucial suelen tener un comportamiento más agresivo (London *et al.*, 2003).
- Índice de crecimiento: las masas pequeñas que crecen lentamente y permanecen localizadas por largo tiempo, tienen mejor pronóstico que los tumores de crecimiento rápido e infiltrante (London *et al.*, 2003).
- Metástasis: su presencia empeora el pronóstico (Gerritsen *et al.*, 1998; London *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2006).

- Estadificación clínica: aunque ha sido desarrollada para fines pronósticos, conforme avanza el estadio clínico no se ha comprobado que empeore el pronóstico. En efecto, estudios sugieren que los MCT múltiples están asociados a bajos índices de metástasis, a buen pronóstico y a largos tiempos de supervivencia cuando se realiza una adecuada resección quirúrgica (London *et al.*, 2003; Mullins *et al.*, 2006).
- Angiogénesis: al igual que el grado histológico y el índice mitótico, se correlaciona con el tiempo de supervivencia del animal (Preziosi *et al.*, 2004).
- Actividad proliferativa: que ha sido medida a través del índice mitótico (Madewell, 2001; Romansik *et al.*, 2007), recuento de regiones nucleolares argirofílicas (AgNORs: inglés) (Simoes *et al.*, 1994; Madewell, 1997; Madewell, 2001; London *et al.*, 2003; Scase *et al.*, 2006), detección de la proteína nuclear Ki67 (Linden *et al.*, 1992; Abadie *et al.*, 1999; London *et al.*, 2003) y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

El antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), también conocido como ciclina, es una proteína nuclear no-histona asociada con la DNA polimerasa δ la cual está presente a través del ciclo celular de células en proliferación. El gen PCNA es transcrito tanto en células en proliferación como en células en reposo; el ARN mensajero PCNA se acumula sólo en células en proliferación, alcanzando un máximo durante la fase S y al término de la fase G1 (Soon Lee, 1996; Madewell, 1997; Madewell, 2001; Scase *et al.*, 2006; Newman, *et al.*, 2007).

PCNA tiene un mayor índice cuando se compara con otros marcadores de células en proliferación, dada su larga vida media y su persistencia, incluso cuando la mitosis ha cesado. Puede además, ser detectado en algunas células durante la reparación del DNA (Soon Lee, 1996).

En MCT, un alto índice de PCNA se correlaciona con grado histológico de

malignidad, tiempo de recurrencia local postquirúrgico y tiempo de supervivencia, en comparación con caninos cuyos tumores tuvieron bajo índice de proliferación (Madewell, 2001). Además, el recuento de PCNA fue significativamente más alto en tumores recurrentes y también en tumores metastásicos, comparados con aquellos MCT que no sufrían recurrencia ni metástasis respectivamente (Simoes *et al.*, 1994; London *et al.*, 2003).

Las células del organismo se dividen en 3 grupos de acuerdo a su capacidad proliferativa y su relación con el ciclo celular. La mayoría de los tejidos maduros contienen una mezcla de las tres: células en división constante, células quiescentes o estables y células no divisibles o permanentes (Cotran *et al.*, 2003). El ciclo celular consta de 4 etapas, siendo la mitosis la fase más corta y donde es posible efectuar el recuento de figuras mitóticas para evaluar proliferación celular (Weinberg, 1996; Madewell, 2001).

En la fase G1 (de “gap”, intervalo), la célula aumenta de tamaño y se prepara para copiar su ADN. El copiado ocurre en la fase siguiente, denominada S (síntesis), durante la cual la célula duplica con precisión su complemento cromosómico. Una vez que los cromosomas se han replicado, la célula entra en la fase G2, donde se prepara para la última fase, M (mitosis), fase donde se divide para engendrar 2 células hijas, cada una de las cuales recibe una serie completa de cromosomas. Las nuevas células hijas entran inmediatamente en fase G1 y continúan el ciclo de nuevo o pueden detenerlo temporal o permanentemente, son células que están en reposo y permanecen en un quinto espacio del ciclo denominado G0 (Weinberg, 1996; Madewell, 2001).

Para programar esta elaborada sucesión de acontecimientos, la célula se vale de un conjunto de moléculas presente en el núcleo que actúan como el reloj del ciclo celular, integrando las señales reguladoras del crecimiento recibidas por la célula y determinando si

ésta debe entrar o no en el ciclo de división. Sus 2 componentes esenciales, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK), se asocian entre sí e inician la entrada en los diferentes estadios del ciclo celular. En G1, las ciclinas de tipo D se unen a la CDK4 o CDK6 y la ciclina E a la CDK2, promocionando el paso a través de la primera fase del ciclo y son esenciales para la transición G1-S. En la fase S se asocia la ciclina A con la CDK2, mientras que las ciclinas A y B unidas a la CDK1 permiten la transición de G2 a M (Weinberg, 1996; Madewell, 2001).

Un momento crucial del ciclo tiene lugar al final de la fase G1, en el punto restrictivo R, cuando la célula decide si debe o no completar el ciclo. Para que la célula pase a través de este punto y entre en la fase S, es preciso que la proteína pRB sea fosforilada. Cuando se forma el complejo ciclina-quinasa, las ciclinas activan a las quinasas, así estas enzimas activadas captan grupos fosfato de las moléculas de ATP y los transfieren a la proteína pRB. Si pRB no está fosforilada, bloquea el ciclo secuestrando otras proteínas: los factores de transcripción. Cuando el complejo ciclina-quinasa añade suficientes fosfatos a pRB, el freno deja de actuar y libera los factores de transcripción, que quedan libres para actuar sobre los genes, estimulando la producción de varias proteínas requeridas en la continuación del ciclo (Weinberg, 1996; Lyons *et al.*, 1997; Madewell, 2001).

Otro gen que actúa en este punto de control, es el gen p53 que codifica a la proteína p53, esta proteína corresponde a un factor de transcripción que es activado en respuesta al daño en el ADN, hipoxia y distintos grados de estrés celular. Así un aumento en sus valores, induce la transcripción de otros genes que detienen el ciclo en la fase G1, constituyendo una barrera cinética para la replicación de un genoma potencialmente dañado. Si la célula no puede reparar el daño genético, p53 induce la muerte celular por un

mecanismo no conocido del todo (Weinberg, 1996; Lyons *et al.*, 1997; Polyak *et al.*, 1997; Evan *et al.*, 1998; Jaffe *et al.*, 2000; Jordán, 2003; Brown *et al.*, 2005).

De esta manera, p53 se convierte en el guardián del genoma y, por extensión, del organismo, vigilando la correcta reparación de alteraciones genéticas originadas por diversos factores externos. Un mal funcionamiento del gen p53 puede promover el desarrollo de tumores lo que es demostrado en la mitad de todos los tipos de tumores humanos donde la proteína p53 no es funcional (Jaffe *et al.*, 2000; Jordán, 2003; Brown *et al.*, 2005).

Para que la célula abandone la fase G1 son necesarios múltiples factores de crecimiento, que actúan en 2 fases distintas denominadas período de competencia y de progresión. Durante el período de competencia actúa el factor plaquetario (PDGF) y el factor fibroblástico (FGF), lo que produce a través de la oportuna señalización intracelular, la transcripción de genes de respuesta temprana inmediata (*fos*, *jun*, *myc*), que producen factores de transcripción y citoquinas. A continuación actúan los factores de progresión como el *factor de crecimiento epidérmico* (EGF) o *insulin like growth factor* (IGF). En esta fase, estos factores inducen la transcripción de genes de respuesta temprana retardada la cual requiere síntesis de proteína. A través de estas proteínas se llega al denominado punto de restricción o punto R (Weinberg, 1996).

En la fase M también se encuentran distintos puntos de control, dentro de ellos destaca el relacionado al ensamblaje mitótico, el cual es responsable de la producción de células hijas genéticamente iguales por medio de la mantención de una precisa segregación cromosómica (Weaver *et al.*, 2005). La aneuploidía dice relación con un estado en que existe un número anormal de cromosomas y es una característica presente en la mayoría de los tumores humanos. Esta anomalía es provocada por una incorrecta segregación durante

la mitosis (Van Deursen, 2007).

Aparece así el punto de control del huso mitótico el cual está formado por una red intrincada de multiproteínas, cuya función es retrasar el inicio de la anafase hasta que todos los cinetocoros se encuentren apropiadamente unidos al huso. La expresión de Mad2 (gen que codifica proteínas que controlan la mantención del número normal de cromosomas según la especie o euploidía) debe ser correctamente regulada porque tanto su sobreproducción como su producción reducida, causa anomalías en la formación de esta red proteica que redundan en la progresión de inestabilidad cromosómica. En modelos de cáncer en humanos, la célula pierde la vía funcional de pRb haciéndose hiperactiva dando como resultado la sobreexpresión de Mad2, lo que lleva a aneuploidías, tetraploidización y daño estructural del cromosoma. Lo anterior, se asocia a la formación de tumores en variados tejidos y tipos celulares (Van Deursen, 2007).

Además, las células carcinogénicas albergan alteraciones que están presentes en puntos clave de la regulación adecuada de la proliferación, diferenciación y comunicación celular. Estas mutaciones dan como resultado células con los fenotipos asociados a un estado maligno. Algunos estudios sugieren que la disfuncionalidad de los telómeros induce mecanismos de reparación de quiebres en el ADN, lo que sugiere que estas estructuras normalmente cubren los extremos de los cromosomas protegiéndolos del reconocimiento de tal zona como un segmento quebrado de ADN (Weinberg, 1996; Hahn, 2004).

Además de esa función protectora, la mantención del estado de los telómeros contribuye al control de la sobrevida replicativa de la célula. La mayoría de las células humanas normales exhiben desgaste de los telómeros con los sucesivos pasajes en cultivos y sólo expresan actividad de la telomerasa en forma temporal (ribonucleoproteína transcriptasa reversa que mantiene la integridad del telómero manteniendo niveles

insuficientes de elongación del telómero). En contraste, la mayoría de los cánceres humanos y las líneas celulares inmortales expresan actividad telomerasa sostenida, manteniendo estabilidad en el largo de los telómeros conforme ocurren los pasajes en cultivo (Hahn, 2004).

Si el sistema de control basado en los telómeros funcionase adecuadamente en las células cancerosas, su proliferación excesiva se abortaría mucho antes de que el tumor alcanzase un tamaño mayor. La expansión peligrosa sería detenida por el programa de senescencia y si la célula evade este bloqueo, se inicia la fase de crisis (Weinberg, 1996).

Muchos genes involucrados en la regulación del ciclo celular, también están implicados en el control de la apoptosis (por ejemplo: c-myc, c-fos, c-jun, p53, quinasas y fosfatasas). Así, las señales que promueven proliferación celular pueden también promover la apoptosis. Si la apoptosis es frenada por señales de supervivencia, ocurre un aumento en el número de células, lo cual puede manifestarse en un cáncer (Lyons *et al.*, 1997; Lawen, 2003).

La iniciación del cáncer es mediada por distintos tipos de genes, que en conjunto constituyen sólo una pequeña proporción de toda la dotación génica del individuo. Los protooncogenes activan el crecimiento, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Considerados en su conjunto, ambos tipos de genes son responsables, en buena medida, de la proliferación celular incontrolada que se observa en los tumores humanos (Weinberg, 1996).

El cáncer se desarrolla a causa de una sobreexpresión de oncogenes (protooncogenes que han sufrido mutaciones) y la inactivación de genes supresores de tumores (TSG) (Weinberg, 1996; Kovvali *et al.*, 2003). Una de las causas de la sobreexpresión de oncogenes es la mutación en regiones de regulación o en genes que

codifican factores que tienen un rol en la regulación de oncogenes. Sin embargo, la alteración genética más notoria que causa sobreexpresión de oncogenes es la amplificación de genes (Kovvali *et al.*, 2003).

La inactivación de TSG puede ocurrir por varias razones, dentro de ellas destacan las mutaciones que pueden causar una disminución en la expresión de genes y/o dar como resultado productos genéticamente inactivos. Sin embargo, como cada célula contiene 2 copias de esos genes, la posibilidad de tener las 2 copias inactivas es baja (Kovvali *et al.*, 2003).

Desde hace años se ha reconocido la importancia de la pérdida de la heterocigocidad en la inactivación de TSG, tal es así que puede ser usada como un indicador de inactivación de TSG o de amplificación de oncogenes. La pérdida de la heterocigocidad ha sido identificada en distintas zonas cromosómicas lo que indica que el número de genes involucrados en el desarrollo de un cáncer puede ser extenso (Kovvali *et al.*, 2003).

Los defectos en una o en varias vías de reparación del ADN pueden ser factores determinantes en la acumulación de mutaciones de genes que participan en la transformación de células normales (Bernstein *et al.*, 2002). Es así que en la práctica clínica algunas drogas usadas en quimioterapia son agentes que causan daño en el ADN, lo cual induce a muerte celular a través de apoptosis por medio de un aumento en las lesiones del ADN y disminución en su reparación (Hampson, 1997).

Los defectos en la reparación del ADN, el daño en los puntos de control del ADN y las anomalías en la mantención de los telómeros causan inestabilidad genómica y crean predisposición al cáncer. Esta inestabilidad genética otorga una posibilidad para que una célula normal pueda acumular suficientes mutaciones que la lleven a ser maligna y es la base de lo que se conoce como la hipótesis mutacional del cáncer (Brown *et al.*, 2005).

Por otro lado, la célula está dotada de importantes mecanismos que la protegen de la inestabilidad genómica. Uno de los más importantes es la puesta en marcha de distintas vías que activan la p53, esta clara dependencia entre apoptosis y actividad de p53 existe en ciertos tipos de tumores. Además, la inhibición de la apoptosis ya sea por inactivación de esta proteína o mediada por sobreexpresión de Bcl2 (proteína anti-apoptótica), causa cambios en la sensibilidad de los tejidos a los agentes químicos que provocan daño en el ADN. En el caso de algunos tumores epiteliales, el control principal no ocurre mediante apoptosis dependiente de p53, sino que se activan otras formas de muerte celular (Brown *et al.*, 2005).

En todo organismo adulto, la cantidad de células que componen un órgano o tejido, debe permanecer constante. Este proceso se conoce como homeostasis y se logra cuando la relación entre generación y muerte de células, se encuentra en equilibrio. La alteración de este equilibrio conduce a situaciones patológicas como el cáncer o enfermedades degenerativas. Es por ello, que en este trabajo se estudió el comportamiento del MCT, en cuanto a su actividad proliferativa (medida a través de la detección del PCNA), pero también evaluando el proceso apoptótico que se desencadena, de modo de evidenciar la ruptura de este equilibrio.

La apoptosis es uno de los principales tipos de muerte celular programada. Corresponde a un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis. Puede tener dos motivos fundamentales, como parte del desarrollo de estructuras corporales o bien, para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo. Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis), desencadenada por señales

celulares controladas genéticamente (Polyak *et al*, 1997).

En estados morfológicamente tempranos se puede observar:

- i. Marginación nuclear de la cromatina, que corresponde a estados tempranos de apoptosis;
- ii. Condensación nuclear y cuerpos apoptóticos intracelulares, en estados medianos;
- iii. Cuerpos apoptóticos en el interior de un fagocito o en el espacio extracelular, en estados tardíos (Jordán, 2003).

La inducción de apoptosis puede ocurrir por estímulos externos o internos. Puede ser activada por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que los rodean), o bien, por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas. Los receptores están localizados, preferentemente, en la membrana citoplasmática y establecen conexiones con el espacio extracelular, recibiendo continuamente señales desde el exterior y de las células vecinas (Lawen, 2003; Jordán, 2003).

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. Puede iniciarse: *i*) en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y *ii*) en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez, entren en mitosis (Weinberg, 1996; Jaffe *et al*, 2000; Madewell, 2001).

En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento, pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción (al final de esta fase) en que se puede

detener el ciclo para corregir defectos celulares (en especial de su ADN), pero si no es posible, se induce el mecanismo de muerte celular (Weinberg, 1996; Jaffe *et al*, 2000; Madewell, 2001).

En la fase G2, también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. De esta manera, durante el ciclo celular se determina cuando la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido (Weinberg, 1996; Jaffe *et al*, 2000; Madewell, 2001).

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, uno de los más estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Existen 14 caspasas de mamíferos identificadas hasta la fecha; estas son sintetizadas como proenzimas, las cuales provocan proteólisis y activación de otras caspasas en una cascada, hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN. La activación de las caspasas, se produce por vías extrínseca e intrínseca donde participan varios complejos moleculares (Lawen, 2003):

➤ La vía extrínseca establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Los receptores, que participan en los procesos de muerte celular, se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya activación siempre conduce a la muerte de la célula, conocidos como “receptores de muerte”- receptor *Fas* y receptor del *factor de necrosis tumoral* (TNF-R) (Ashkenazi *et al*, 1998; Lawen, 2003) y aquellos que desempeñan una función fisiológica, pero su sobreactivación puede

conducir también a la muerte como receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje (Jordán, 2003).

La proteína transmembrana *Fas*, en su porción intracelular, enlaza con un factor intermedio denominado FADD (Fas-associated death domain), nombre que sólo señala que está comprometido con la zona de la molécula *Fas* que participa en la muerte celular, activando las caspasas 8 y 10. En cambio, si la parte interna de la molécula se asocia a otro factor llamado DaXX, se activan proteína-kinasas que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía *Fas* permanece inactiva hasta que se produce, en su parte externa, el enlace con un cofactor llamado *ligando Fas*, proteína que actúa como detonador encendiendo una vía donde sólo las caspasas están inactivas y el resto de la cadena está preparada para recibir el enlace exterior. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (Ashkenazi *et al*, 1998; Jordán, 2003; Lawen, 2003). El complejo de *Fas*, *FasL*, FADD y pro-caspasa 8 o 10 es llamado complejo de señales inductoras de muerte celular (DISC). Las moléculas de pro-caspasa 8 son llevadas dentro de las proximidades del DISC, entonces ellas pueden transactivar a otras. La caspasa 8 activada puede segmentar, directamente, a la caspasa 3 u otra caspasa de ejecución, permitiendo el desarrollo de la apoptosis. La caspasa 8 también puede segmentar a la BH3 - proteína pro-apoptótica componente del Bid (complejo proteínico que conecta la vía extrínseca con la mitocondrial). La Bid segmentada resultante se mueve hacia la mitocondria e induce la liberación del *citocromo C*, permitiendo la activación de las caspasas 9 y 3 (Ashkenazi *et al*, 1998; Lawen, 2003).

Algo similar sucede con el otro receptor de membrana TNF, cuya porción intracelular conecta con complejos intermedios como el TRADD (TNFR-associated death domain) y Raidd (receptor associated interleukine death domain) que activan caspasas

"iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (TNF receptor associated factor) activan proteína-kinasas y estimulan la proliferación celular, es decir, el efecto contrario. A diferencia de *Fas*, el receptor de TNF raramente activa procesos de apoptosis, a menos que la síntesis de proteínas se encuentre bloqueada, sugiriendo la existencia de factores celulares que suprimen los estímulos apoptóticos generados por el TNF (Ashkenazi *et al*, 1998; Jordán, 2003; Lawen, 2003).

Por último, los receptores del aminoácido neurotransmisor glutamato participan en más del 80% de las sinapsis excitadoras del SNC y se han relacionado con los procesos que rodean a la memoria y a la transmisión nerviosa. Sin embargo, su sobreestimulación puede desencadenar la muerte neuronal –excitotoxicidad- descrita en los procesos como isquemia/reperfusión, infarto, esclerosis lateral amiotrófica o enfermedad de Parkinson (Jordán, 2003).

➤ Vía intrínseca: una vez que la célula recibe una señal de muerte, debe decidir si sobrevive o desencadena los procesos de muerte, en esta fase se ha situado a la mitocondria como organelo fundamental (Jordán, 2003; Lawen, 2003).

La vía mitocondrial es activada por una variedad de estímulos extra e intracelulares, incluyendo el estrés oxidativo, el tratamiento con drogas citotóxicas (Lawen, 2003), irradiación gamma o ultravioleta o la falta de factores de sobrevivencia como IL-1 y varias otras citoquinas que activan los receptores de muerte (Renehan *et al*, 2001). Uno de los acontecimientos principales que tienen lugar en ella, es la alteración de la permeabilidad de su membrana debido a la formación de un complejo multiproteico (poro de permeabilidad transitoria mitocondrial) que conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como el *citocromo C*, el *factor inductor de apoptosis* (AIF) (el cual aparentemente induce apoptosis independiente de caspasas) y miembros de la familia de

caspasas (Jordán, 2003; Lawen, 2003).

La señal apoptótica entonces, libera el *citocromo C* al citosol, donde se une al factor activador de proteasa apoptótico 1 (*Apaf-1*: inglés), un homólogo de mamíferos de *CED-4* (Lawen, 2003). La unión del *citocromo C* al *Apaf-1* genera la formación del apoptosoma. El destino del apoptosoma es activar la pro-caspasa 9, así puede entonces, activar una caspasa efectora (por ejemplo la caspasa 3), la cual segmenta los sustratos celulares necesarios para el desarrollo de la apoptosis (Lawen, 2003).

Otros episodios son alteraciones en la cadena transportadora de electrones, pérdida del potencial electroquímico de membrana y cambios del ciclo metabólico de óxido/reducción (Jordán, 2003).

Una de las técnicas para detectar apoptosis es a través del método inmunohistoquímico TUNEL, donde se detectan los extremos de ADN hidrolizados por medio de nucleótidos marcados con digoxigenina, los cuales son enzimáticamente adheridos al ADN, por medio de una enzima: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación de factores pronósticos de crecimiento tumoral según los grados de diferenciación histopatológicos en mastocitoma cutáneo canino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Reclasificación de mastocitomas cutáneos de acuerdo al grado de diferenciación histológico.
- 2 Detectar y cuantificar células en proliferación mediante la expresión de proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular).
- 3 Evaluar la actividad apoptótica mediante detección de la fragmentación de ADN.
- 4 Relacionar la actividad proliferativa y apoptótica con el grado de diferenciación tumoral.

4. MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de muestras

Se utilizaron muestras diagnosticadas como MCT sin distinción de edad, sexo ni raza, procedentes de casos de archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en el período comprendido entre los años 2004-2005. Con este fin se procedió de la siguiente forma:

- 1°.- Ubicación de las biopsias diagnosticadas como mastocitomas en el archivo durante el período.
- 2°.- Ubicación de los cubos histopatológicos existentes.
- 3°.- Clasificación macroscópica de las preparaciones con el objeto de seleccionar aquellas que aún tenían muestra.
- 4°.- En las muestras recolectadas se realizaron cortes de 4 μ m de grosor por muestra en un micrótopo de rotación para efectuar las técnicas histológicas, en microscopía óptica, que a continuación se describen.

Diagnóstico histopatológico de mastocitoma cutáneo canino

Para confirmar el diagnóstico de MCT, se montaron los cortes sobre portaobjetos albuminados y se realizaron las siguientes técnicas:

- Hematoxilina-Eosina (H/E) (López *et al.*, 1985): para ver morfología general y seleccionar las muestras donde fue posible distinguir tejido tumoral.
- En estas biopsias ya seleccionadas se usó el Azul de toluidina (A/T) a pH 2,5 para detección de gránulos metacromáticos intracitoplasmáticos que se tiñen de rojo púrpura (tinción metacromática) y el fondo azul (tinción ortocromática) (ver anexo/protocolo 1).

Esta técnica permitió reclasificar las muestras y con estos resultados, se seleccionaron 10 tumores de cada grado (GI, GII y GIII).

Técnicas inmunohistoquímicas

Para estas técnicas se montaron cortes de los 30 tumores seleccionados sobre portaobjetos silanizados y se realizaron las siguientes técnicas:

- Apoptosis: para este estudio se utilizó un Kit específico para la detección de apoptosis; “ApopTag ® Plus Peroxidase *in situ* apoptosis detection Kit”, Cat. S7101, Lot. 2C002 INTERGEN company, USA (ver anexo/protocolo 2).

Este kit evidencia el ADN fragmentado por medio de nucleótidos marcados con antidigoxigenina los cuales son enzimáticamente adheridos al ADN, a través de la enzima TdT. Luego la enzima Peroxidasa (DAB), genera un marcaje permanente e intenso por medio de sustratos cromogénicos.. Los resultados positivos revelan una inmunomarcación “*in situ*”, de color marrón, dentro de núcleos y cuerpos apoptóticos.

- Proliferación celular: se realizó a través de la detección del antígeno de proliferación celular PCNA, para lo cual se utilizó (ver anexo/protocolo 3) el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-PCNA humano, Sigma Chemical P-8825 Alemania y el anticuerpo secundario biotinilado de conejo anti- inmunoglobulina de ratón, Dako E 0354 Dinamarca. Para amplificar y visualizar la reacción se utilizó el conjugado Estreptavidina / Peroxidasa, CHEMICON SA202 Australia y se reveló la reacción enzimática con Diaminobencina (DAB), DAKO K3466 Dinamarca, que entrega una inmunomarcación positiva de color marrón.

Estudio morfométrico

Se obtuvieron las áreas de tinción metacromática e inmunomarcada para apoptosis y proliferación según grado histopatológico de cada uno de los tumores estudiados, para lo cual se utilizó un microscopio óptico científico (Nikon Eclipse E-600). En cada tumor se midieron 5 campos ópticos, usando una magnificación de 400X. Las imágenes fueron capturadas con una videocámara digital (Cool Snap-Pro CF, Media Cybernetic, USA) montada al microscopio, con una resolución de 512 X 480 pixeles conectadas a un computador, donde fueron analizadas usando un software morfométrico Image Pro-Plus (Media Cybernetics, USA) que cuantifica el área total con reactividad positiva dentro de cada campo. Se calculó el área promedio de tinción de los 5 campos correspondientes a cada neoplasia.

Evaluación de los resultados

Se realizó un estudio descriptivo de los MCT GI, GII y GIII en las muestras seleccionadas con tinción H/E y A/T e inmunomarcadas con PCNA y TUNEL.

Se realizaron análisis de varianza para las mediciones de área inmunomarcada para apoptosis (TUNEL), proliferación (PCNA) y granulación metacromática (A/T), según grado histopatológico.

Se determinó una correlación de Pearson ($p \leq 0,05$) entre los resultados de área obtenidos a través de las técnicas inmunohistoquímicas (proliferación y apoptosis) y metacromática.

5. RESULTADOS

Obtención de muestras

- Del archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se ubicaron 95 muestras clasificadas como MCT durante los años 2004 (63 muestras) y 2005 (32 muestras).
- Posteriormente se procedió a cortar todas las muestras obtenidas para confirmar la presencia de tejido tumoral, para lo cual se tiñeron con H/E. El análisis histopatológico de estas biopsias se muestra en la Tabla N°1.

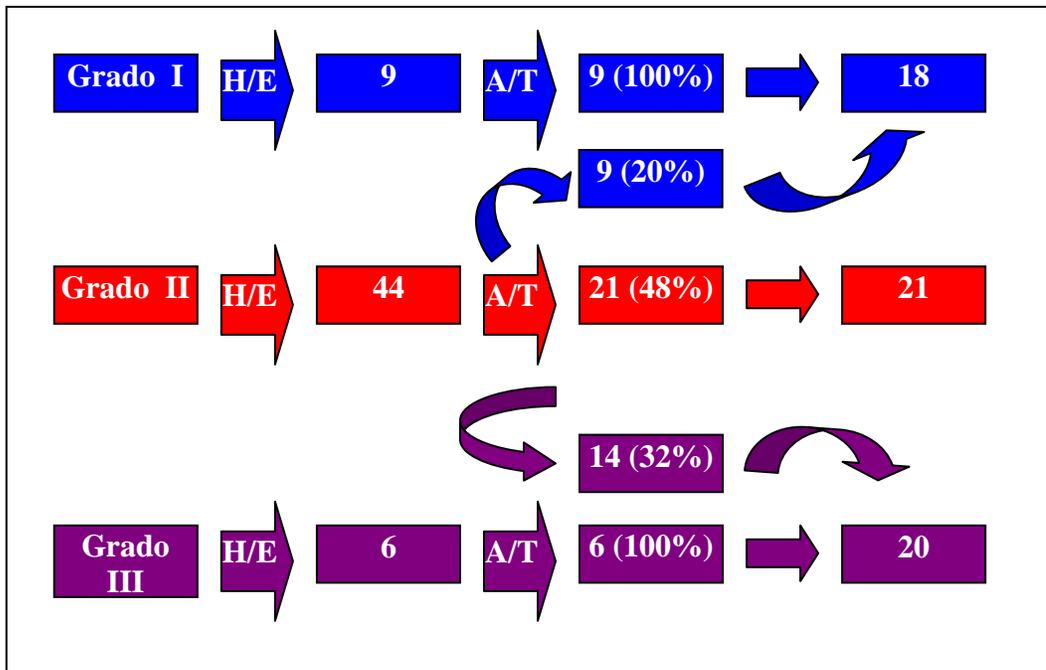
Tabla N°1. Número de biopsias correspondientes a Mastocitoma cutáneo canino procedentes del archivo del Laboratorio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile durante los años 2004 y 2005.

Criterio / Año	2004	2005	Total
Clasificadas	63	32	95
No encontradas	7	-	7
Mal archivadas	6	2	8
Eliminadas *	13	8	21
Total utilizadas	37	22	59
GI	7	2	9
GII	28	16	44
GIII	2	4	6

Confirmación diagnóstica

➤ Al total de muestras clasificadas como MCT GI (9), GII (44) y GIII(6), se aplicó el método de A/T a pH 2,5 para reconocer los gránulos metacromáticos característicos de los mastocitos diferenciados y confirmar el diagnóstico. El resultado de este análisis señaló que: las biopsias GI, GIII y 21 tumores GII mantuvieron el diagnóstico inicial. Los restantes MCT GII (23) fueron reclasificados como se indica en la Figura 1.

Figura 1. Reclasificación de muestras previamente teñidas con H/E luego de utilizar el A/T a pH 2,5 en cada grado de MCT.



* flechas curvas indican cambio de grado.

Características histopatológicas del Mastocitoma cutáneo canino

➤ En las muestras reclasificadas (59) se observaron las siguientes características histopatológicas en cada grado:

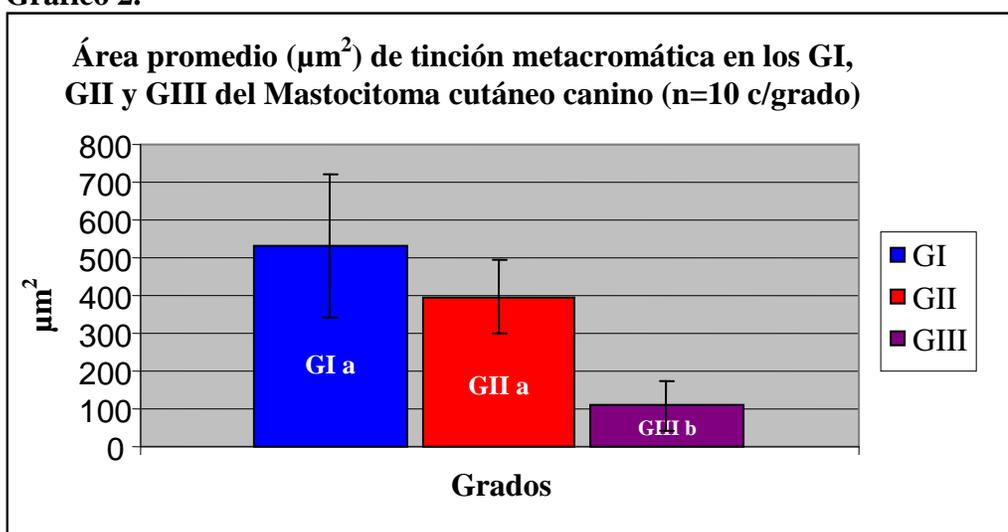
- MCT GI: Del total de muestras reclasificadas, un 30% (n=18) estaban confinados a la dermis y contenían mastocitos bien diferenciados, dispuestos en hilera o en pequeños grupos, mostrando escasas figuras mitóticas y gránulos citoplasmáticos grandes de intensa tinción (figura 2). Además se observa que el área de inmunomarcación positiva a PCNA y TUNEL involucra a un escaso número de células que corresponden a mastocitos bien diferenciados (figuras 5 y 8).
- MCT GII: Del total de muestras reclasificadas, un 36% (n=21) presentaron moderada a alta cantidad de células infiltradas en la dermis y tejido subcutáneo, mastocitos moderadamente diferenciados con límites citoplasmáticos indefinidos, raras figuras mitóticas y menor cantidad de gránulos (figura 3). El área de inmunomarcación positiva a TUNEL involucró un escaso número de mastocitos bien diferenciados y por otro lado, los mastocitos inmunomarcados con PCNA se observaron en mayor cantidad (figuras 6 y 9).
- MCT GIII: Del total de muestras reclasificadas, un 34% (n=20) presentaron células infiltradas en dermis, subcutáneo y tejidos adyacentes con alto pleomorfismo celular, límites citoplasmáticos indefinidos, frecuentes figuras mitóticas y evidente disminución en la cantidad y tinción de gránulos citoplasmáticos (figura 4). En el área inmunomarcada con PCNA se observó gran cantidad de células positivas pleomórficas que correspondían a mastocitos, mientras que los resultados obtenidos con TUNEL revelaron un importante número de mastocitos, negativos a la inmunomarcación, con un alto grado de anaplasia y pleomorfismo (figuras 7 y 10).

➤ De este grupo final se seleccionaron las 10 mejores muestras de cada grado de acuerdo al tamaño muestral y al grado claramente definido del MCT, a las cuales se aplicó las técnicas inmunohistoquímicas para medir proliferación celular (PCNA) y apoptosis (TUNEL). Finalmente se efectuó el análisis morfométrico a estas variables y al método metacromático (A/T).

Morfometría

En las 30 muestras seleccionadas se midieron las áreas metacromáticas, donde la mayor área promedio se obtuvo en mastocitoma GI (530,85 μm^2) y fue disminuyendo hacia el GIII (107,92 μm^2). Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el GI v/s GIII y entre el GII v/s GIII ($p \leq 0,05$) como se muestra en el gráfico 2 y tabla N°2.

Gráfico 2.



Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$)

Tabla N°2. Área promedio de tinción metacromática con A/T al 2,5% (n=30) y desviaciones estándar (D.E) en biopsias de Mastocitoma cutáneo canino GI, GII y GIII.

Grado	N	Media / D.E	Mínimo	Máximo
I	10	530,85 ^a ± 190,54	252,93	790,47
II	10	396,62 ^a ± 98,28	258,40	578,20
III	10	107,92 ^b ± 63,32	29,81	225,22

Letras distintas en columna indican diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,05$).

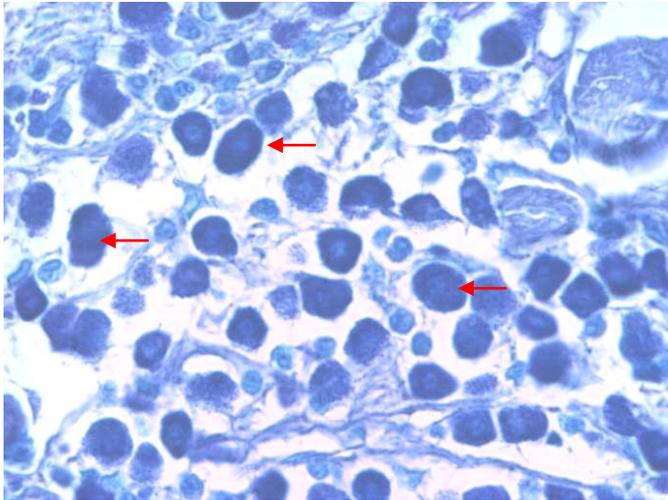


Figura 2.

Mastocitoma cutáneo canino GI.
Se observan mastocitos bien diferenciados con abundantes gránulos metacromáticos (flechas).
Tinción Azul de Toluidina. Aum: 400X.

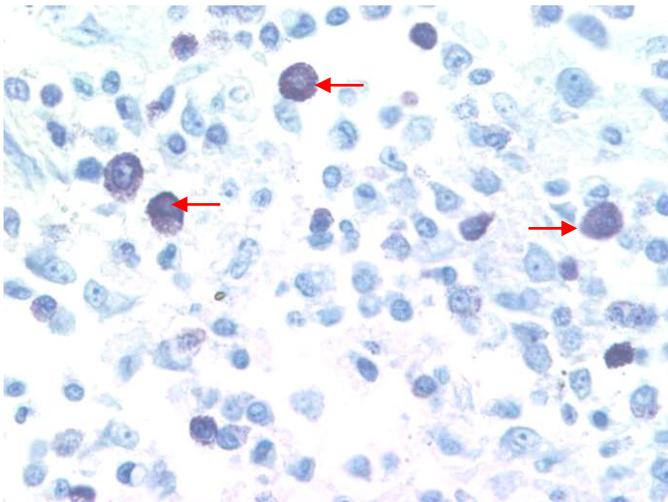


Figura 3.

Mastocitoma cutáneo canino GII.
Se observa menor cantidad de mastocitos con gránulos metacromáticos (flechas).
Tinción Azul de Toluidina. Aum: 400X.

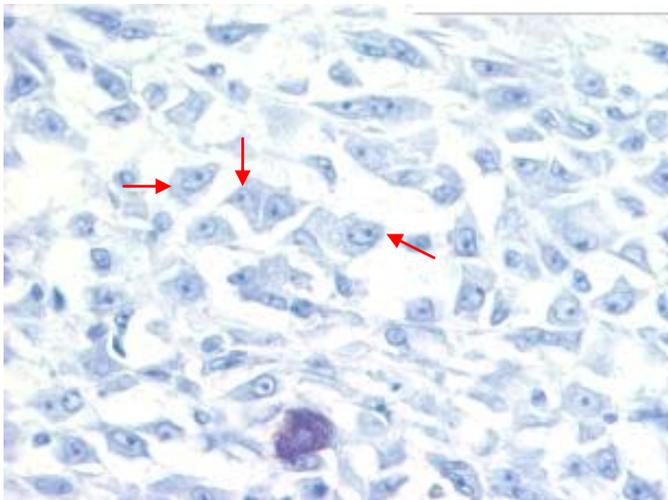


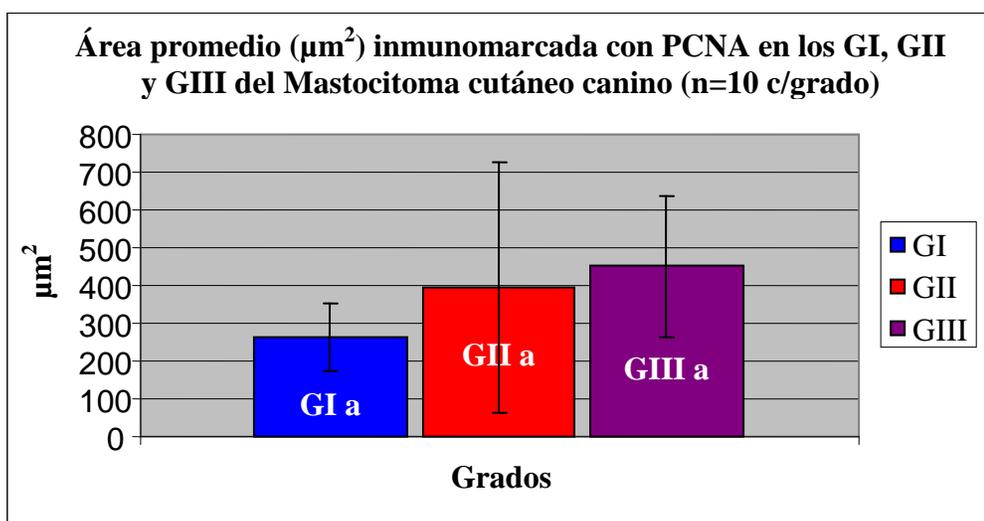
Figura 4.

Mastocitoma cutáneo canino GIII.
Predominio de mastocitos indiferenciados sin presencia de gránulos metacromáticos (flechas).
Tinción Azul de Toluidina. Aum: 400X.

Proliferación Celular

La medición del área promedio inmunomarcada con PCNA mostró que la menor área se obtuvo en MCT GI ($262,36 \mu\text{m}^2$) y fue aumentando hacia el GIII ($450,41 \mu\text{m}^2$), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$) como se muestra en el gráfico 3 y tabla N°3. En las figuras 5 y 6 se observa la inmunomarcación positiva en los GI y GIII respectivamente.

Gráfico 3.



No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla N°3. Área promedio inmunomarcada con PCNA ($n=29$) y desviaciones estándar (D.E) en biopsias de Mastocitoma cutáneo canino GI, GII y GIII.

Grado	N	Media / D.E	Mínimo	Máximo
I	9	$262,36^a \pm 90,72$	95,03	417,32
II	10	$393,21^a \pm 331,24$	158,11	1291,66
III	10	$450,41^a \pm 186,15$	207,52	695,88

No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

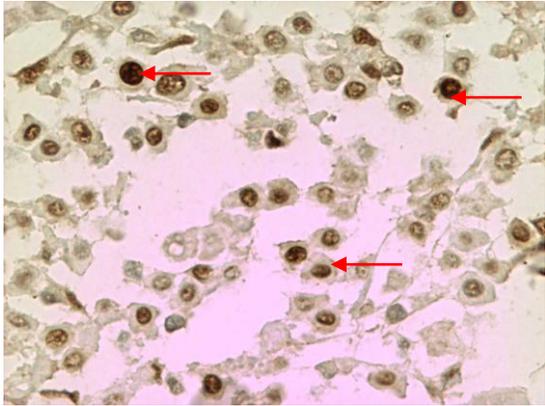


Figura 5.

Mastocitoma cutáneo canino GI.
Inmunomarcación positiva de color marrón en un escaso número de mastocitos (flechas).
Inmunohistoquímica con Ac. anti-PCNA.
Aum: 400X.

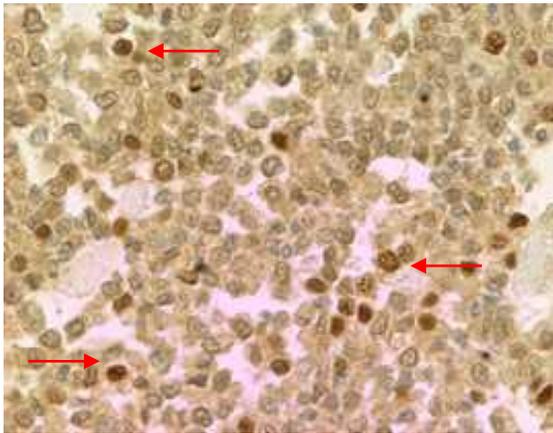


Figura 6.

Mastocitoma cutáneo canino GII.
Inmunomarcación positiva de color marrón en varios mastocitos (flechas).
Inmunohistoquímica con Ac. anti-PCNA.
Aum: 400X.

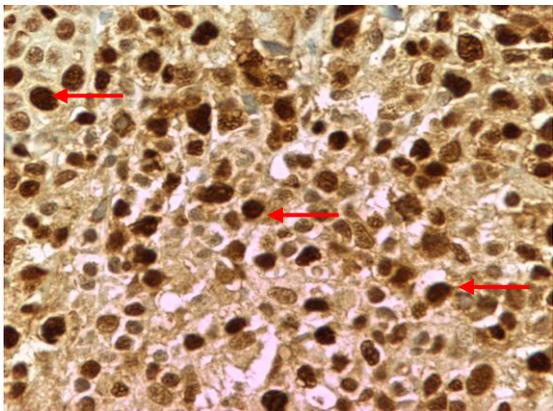


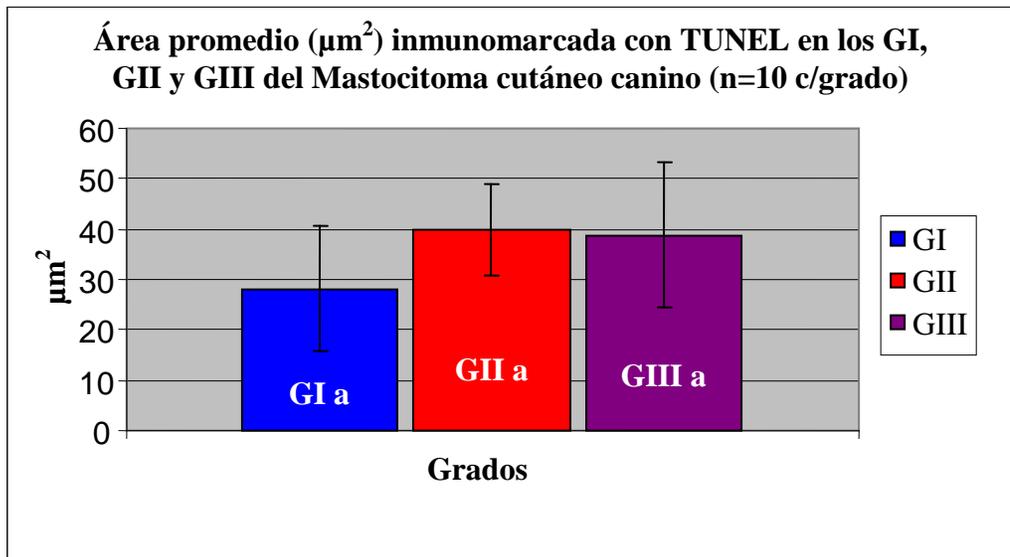
Figura 7.

Mastocitoma cutáneo canino GIII.
Inmunomarcación positiva de color marrón en gran cantidad de mastocitos (flechas).
Inmunohistoquímica con Ac. anti-PCNA.
Aum: 400X.

Apoptosis

La medición del área promedio inmunomarcada con TUNEL mostró que la menor área se obtuvo en MCT GI ($28,17 \mu\text{m}^2$) y la mayor en GII ($39,77 \mu\text{m}^2$), sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$) como se muestra en el gráfico 4 y tabla N°4. En las figuras 7 y 8 se observa la inmunomarcación positiva en los GI y GIII respectivamente.

Gráfico 4.



No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Tabla N°4. Área promedio inmunomarcada con TUNEL ($n=15$) y desviaciones estándar (D.E) en biopsias de Mastocitoma cutáneo canino GI, GII y GIII.

Grado	N	Media / D.E	Mínimo	Máximo
I	5	$28,17^a \pm 12,42$	13,13	41,85
II	5	$39,77^a \pm 9,09$	29,31	51,96
III	5	$38,85^a \pm 14,31$	22,24	60,78

No se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

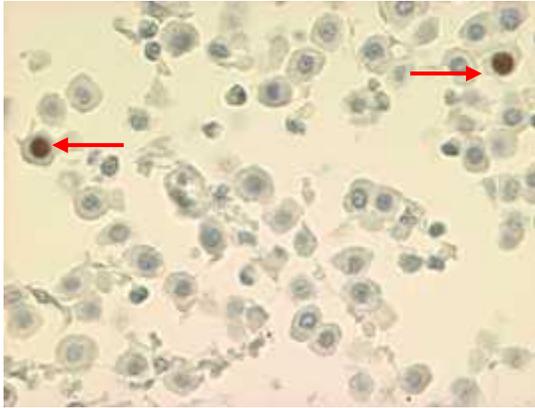


Figura 8.

Mastocitoma cutáneo canino GI.
Inmunomarcación positiva de color marrón en un escaso número de mastocitos (flecha).
Inmunohistoquímica con método TUNEL.
Aum: 400X.

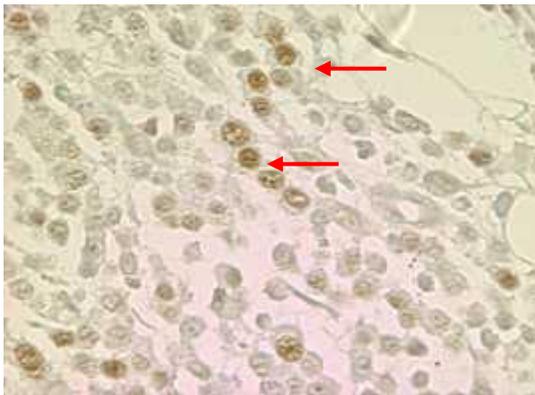


Figura 9.

Mastocitoma cutáneo canino GII.
Inmunomarcación positiva de color marrón en algunos mastocitos (flechas).
Inmunohistoquímica con método TUNEL.
Aum: 400X.

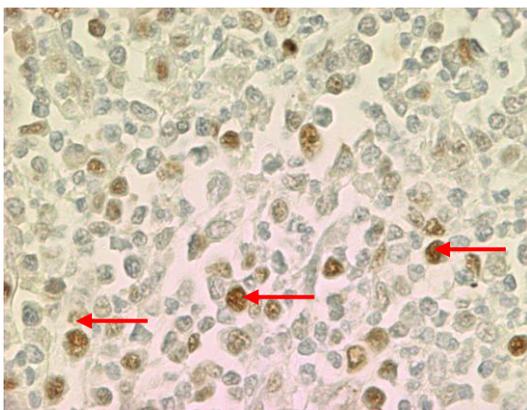


Figura 10.

Mastocitoma cutáneo canino GIII.
Inmunomarcación positiva de color marrón en algunos mastocitos (flechas).
Inmunohistoquímica con método TUNEL.
Aum: 400X.

Correlaciones

Las correlaciones y probabilidades de las variables: área metacromática, área proliferativa y área apoptótica para los MCT GI, II y III se muestran en la Tabla N°5.

Tabla N°5. Correlación entre las mediciones de área proliferativa (AP) y apoptótica (AA), entre el área proliferativa y metacromática (AM) y entre el área apoptótica y metacromática para el Mastocitoma cutáneo canino GI, II y III.

Grado / Variable	AP / AA	AP / AM	AA / AM
I	0,75	-0,04	-0,08
II	0,24	0,98*	0,19
III	0,04	-0,04	0,98*

* Indican una correlación positiva fuerte ($\geq 0,75$) con alta probabilidad ($\leq 0,05$).

6. DISCUSIÓN

En esta memoria se aplicaron distintos métodos histológicos con el objeto de obtener un diagnóstico que permita diferenciar, en forma más precisa, los tres grados del mastocitoma cutáneo canino.

Así, el análisis de los resultados demostró, que la morfología celular descrita en los cortes histopatológicos teñidos según el protocolo con H/E, coincide con lo descrito por otros autores (Patnaik *et al.*, 1984; Strefezzi *et al.*, 2003; Gieger, 2004; Fernandez *et al.*, 2005 y Fulcher *et al.*, 2006), destacándose, en el MCT GI, la presencia de mastocitos bien diferenciados con gránulos citoplasmáticos de gran tamaño y escasas figuras mitóticas, a diferencia del MCT GIII cuyas células son marcadamente indiferenciadas con ausencia de gránulos citoplasmáticos y mitosis frecuentes.

La técnica H/E, de uso rutinario en todos los laboratorios de Histopatología, es un método útil, de bajo costo y fácil aplicación, sin embargo, no permitiría un diagnóstico concluyente en MCT GII ya, que el 52% de los tumores analizados en esta memoria, modificaron su clasificación hacia GI o GIII al aplicar el método metacromático. El alto porcentaje de tumores reclasificados, se debería a la heterogeneidad encontrada en los mastocitos, lo que dificultó su diagnóstico diferencial con H/E. Estos resultados son consistentes con los descritos por otros autores (Scase *et al.*, 2006; Séguin *et al.*, 2006), quienes también encontraron el mismo grado de dificultad al diagnosticar los mastocitomas de este grupo.

La descripción morfológica de los mastocitomas teñidos con el método de A/T para detectar la metacromasia de los gránulos citoplasmáticos, característicos de los mastocitos bien diferenciados, facilitó el diagnóstico diferencial entre los grados tumorales, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre MCT GI y II. Este análisis permitiría sugerir la incorporación del método A/T, como protocolo de uso rutinario para confirmar el grado de diferenciación, en biopsias de piel de MCT positivos a H/E coincidiendo con lo expuesto en trabajos anteriores (Ozaki *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*, 2003; Strefezzi *et al.*, 2003; Fernández *et al.*, 2005).

La técnica de azul de toluidina, así como la H/E, también es de bajo costo económico, rápida aplicación y de fácil implementación en el laboratorio (Fernández *et al.*, 2005; Romansik *et al.*, 2007). Sin embargo, por sí sola no proveería un diagnóstico concluyente de MCT especialmente en el GIII, donde el alto nivel de anaplasia podría otorgar falsos positivos al no detectar reacción metacromática en las células tumorales (Ozaki *et al.*, 2002; Séguin *et al.*, 2006; Romansik *et al.*, 2007).

A través de la técnica inmunohistoquímica con PCNA se observó, que la actividad proliferativa de mastocitos tiende a incrementarse a medida que aumenta el estado de malignidad, aunque los valores no demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$). Nuestros resultados morfológicos, son consistentes con lo expuesto por Simoes *et al.* (1994), Abadie *et al.* (1999), Scase *et al.* (2006), quienes demuestran una correlación entre un aumento del número de células en proliferación con el comportamiento biológico del MCT y con Madewell, (2001) que describe una correlación entre un alto índice de PCNA con el grado histológico de malignidad.

La baja reactividad de apoptosis encontrada a través de la técnica inmunohistoquímica TUNEL en los 3 grados del MCT, donde no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grados ($p > 0,05$), sugiere que la inhibición de apoptosis es parte de la patogénesis de esta enfermedad, tal como ocurre en la mastocitosis humana (Hartmann *et al.*, 2003); esto se podría deber a mutaciones y/o supresión de genes supresores de tumores (TSG) y alteraciones de sus productos, como ausencia o mutación de p53, aumento de Bcl-2 o actividad telomerasa sostenida, entre otras.

El análisis de correlación entre el área proliferativa y metacromática entrega una alta correlación sólo en el grupo de MCT GII lo que es consistente con el carácter heterogéneo descrito para este grado tumoral, también respaldado por los resultados obtenidos con azul de toluidina, donde el 52% de los mastocitomas GII fueron reclasificados hacia GI o GIII. Diversos autores (Maiolino *et al.*, 2005; Scase *et al.*, 2006; Séguin *et al.*, 2006; Romansik *et al.*, 2007), coinciden en definir al MCT GII como de alta heterogeneidad y de compleja tipificación. Incluso, Scase *et al.* (2006) sugiere una subdivisión de este grado en dos tipos basada en los valores de proliferación celular obtenidos con Ki-67.

El análisis de correlación entre el área apoptótica y metacromática, que mostró una fuerte asociación sólo en el grupo de MCT GIII, no es consistente con los hallazgos morfológicos descritos, donde la mayoría de los mastocitos presentaron pleomorfismo celular, anaplasia, núcleos de tamaño y forma irregular y ausencia de gránulos citoplasmáticos, coincidiendo con lo descrito por Patnaik *et al.* (1984) para este grado tumoral.

7. CONCLUSIONES

- La aplicación del método de Azul de Toluidina pH 2,5 en mastocitomas cutáneos del canino, diagnosticados previamente con método de H/E, permite discriminar morfológicamente a los tumores GII y reclasificarlos en GI o GIII, según actividad metacromática. Por esto, es recomendable la incorporación del A/T en biopsias de piel, como método de rutina que complementa la tinción corriente con H/E.
- La técnica de metacromasia es un método de fácil y rápida aplicación y de bajo costo económico.
- El mastocitoma GIII presentó un área metacromática significativamente menor que el GI y GII, indicando la pérdida de los gránulos citoplasmáticos a medida que los mastocitos se transforman en células anaplásicas y aumentando, por consiguiente, el grado de malignidad del MCT.
- La actividad proliferativa inmunomarcada con PCNA ni la actividad apoptótica detectada con el método TUNEL, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grados del mastocitoma.

➤ Las características histológicas observadas a través de los métodos utilizados, permitieron discriminar las diferencias existentes en cada grupo de MCT. Así el mastocitoma GI evidencia características compatibles con un tumor bien diferenciado de carácter benigno. El mastocitoma GIII, por el contrario, fue compatible con un tumor altamente anaplásico (maligno) y el mastocitoma GII presentó características intermedias de diferenciación, lo que podría conducir a error en su clasificación histopatológica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- **ABADIE, J.J.; AMARDEILH, M.A.; DELVERDIER, M.E.** 1999. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki67 in mast cell tumors from dogs. *JAVMA*. 215(11):1629-1634.
- **ASHKENAZI, AVI.; DIXIT, V.M.** 1998. Apoptosis – Death receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 281:1305-1308.
- **BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C.M.; GAREWALL, H.** DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res*. 511:145-178.
- **BROWN, J.M.; ALLARDI, L.D.** 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nature*. 5:231-237.
- **COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.** 2003. Patología estructural y funcional. Mc Graw-Hill Interamericana. sexta edición. 1:1-31; 8:277-347.
- **CHAFFIN, K.; THRALL, D.E.** 2002. Results of radiation therapy in 19 dogs with cutaneous mast cell tumor and regional lymph node metastasis. *Vet. Rad. Ultrasound*. 43(4):392-395.
- **EVAN, G.; LITTLEWOOD, T.** 1998. A matter of life and cell death. *Science*. 281:1317-1322.
- **FERNANDEZ, N.J.; WEST, K.H.; JACKSON, M.L.; KIDNEY, B.A.** 2005. Immunohistochemical and Histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet. Pathol*. 42:437-445.
- **FOX, L.E.** 1998. Mast cell tumors. **In:** Morrison, W.B. *Cancer in dogs and cats*. Williams and Wilkins. Baltimore. pp:477-486.
- **FRIMBERGER, A.E.; MOORE, A.S.; LARUE, S.M.; GLIATTO, J.M.; BENGTON, A.E.** 1997. Radiotherapy of incompletely resected moderately differentiated mast cell tumors in the dog: 37 cases (1989-1993). *JAAHA*. 33(4):320-324.
- **FULCHER, R.P.; LUDWIG, L.L.; BERGMAN, P.J.; NEWMAN, S.J.; SIMPSON, A.M.; PATNAIK, A.K.** 2006. Evaluation of two centimeter lateral surgical margin for excision of grade I and grade II cutaneous mast cell tumors in dogs. *JAVMA*. 228(2):210-215.
- **GERRITSEN, R.J.; TESKE, E.; KRAUS, J.S.; RUTTEMAN, G.R.** 1998. Multiagent chemotherapy for mast cell tumors in the dog. *Vet. Quart*. 20(1):28-31.

- **GIEGER, T.** 2004. Canine cutaneous mast cell tumors: Current concepts for patient management. *DVM.* 4-10.
- **HAHN, K.A.; KING, G.K.; CARRERAS, J.K.** 2004. Efficacy of radiation therapy for incompletely resected grade III mast cell tumors in dogs: 31 cases (1987-1998). *JAVMA.* 224(1):79-82.
- **HAHN, W.C.** 2004. Cancer: Surviving on the edge. *Cancer Cell.* 6:215-222.
- **HAMPSON, R.** 1997. Selection for genome instability by DNA damage in human cells: unstable microsatellites and their consequences for tumorigenesis. *Radiat. Oncol. Investig.* 5:111-114.
- **HARTMANN, K.; HERMES, B.; RAPPERSBERGER, K.; SEPP, N.; MEKORIS, Y.A.; HENZ, B.M.** 2003. Evidence for altered mast cell proliferation and apoptosis in cutaneous mastocytosis. *Br. J. Dermatol.* 149:554-559.
- **ISHIGURO, T.; KADOSAWA, T.; TAKAGI, S.; KIM, G.; OHSAKI, T.; BOSNAKOVSKI, D.; OKUMURA, M.; FUJINAGA, T.** 2003. Relationship of disease progression and plasma histamine concentrations in 11 dogs with mast cell tumors. *J. Vet. Intern. Med.* 17(2):194-198.
- **JAFFE, M.H.; HOSGOOD, G.; TAYLOR, H.W.; KERWIN, S.C.; HEDLUND, C.S.; LOPEZ, M.K.; DAVIDSON, J.R.; MILLER, D.M.; PARANJPE, M.** 2000. Immunohistochemical and clinical evaluation of p53 in canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 37:40-46.
- **JORDÁN, J.** 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *Offarm.* 22(6):100-106.
- **KITCHELL, B.E.** 2000. Canine mast cell tumors remain serious clinical problem. *DVM.* pp:1.
- **KOVVALI, G.; SHIFF, S.; TELANG, N.; DAS, K.; KOHGO, Y.; NARAYAN, S.; LI, H.** 2003. Carcinogenesis: The more we seek to know the more we need to know - Challenges in the post Genomic Era. *J. of Carcin.* 2:1-5.
- **LAWEN, A.** 2003. Apoptosis-an introduction. *BioEssays.* 25(9):888-896.
- **LEMARIÉ, J.R.; LEMARIÉ, L.S.; HEDLUND, S.C.** 1996. Mastocitoma. *Selecciones Veterinarias Virtual.* 4(1). [en línea]
<http://www.seleccionesveterinarias.com/articulos/art4_1.html>
- **LINDEN, M.D.; TORRES, F.X.; KUBUS, M.S.; ZARBO, R.J.** 1992. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessments of cell proliferation. **In:** *Am. J. Clin. Pathol.* 97 suppl. 1:S4-S13.

- **LONDON, C.A.; SEGUIN, B.** 2003. Mast cell tumors in the dog. **In:** Vet. Clin. Small Anim. 33:473-489.
- **LOPEZ, M.A.; GRAF, M.E.; LEYTON, C.** 1985. Técnicas de Histología y Citología. Editado por Dpto. de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Chile. pp:36-37.
- **LYONS, S.K.; CLARKE, A.R.** 1997. Apoptosis and carcinogenesis. Br. Med. Bull. 52(3):554-569.
- **MADEWELL, B.R.** 1997. Tumor Markers. **In:** Clinical Biochemistry of Domestic Animals. edit. by Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. fifth edition. pp:761-784.
- **MADEWELL, B.R.** 2001. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. J. Vet. Intern. Med. 15:334-340.
- **MAIOLINO, P.; CATALDI, M.; PACIELLO, O.; RESTUCCI, B.; DeVICO, G.** 2005. Nucleomorphometric analysis of canine cutaneous mast cell tumors. J. Comp. Path. 133:209-211.
- **MISDORP, W.** 2004. Mast cells and canine mast cell tumors. A review. Vet. Quart. 26(4):156-169.
- **MULLINS, M.N.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J.; EHRHART, E.J.; THAMM, D.H.; LANA, S.E.** 2006. Evaluation of prognostic factors associated with outcome in dogs with multiple cutaneous mast cell tumors treated with surgery with and without adjuvant treatment: 54 cases (1998-2004). JAVMA. 228(1):91-95.
- **MURPHY, S.; SPARKES, A.H.; SMITH, K.C.; BLUNDEN, A.S.; BREARLEY, M.J.** 2004. Relationships between the histological grade of cutaneous mast cell tumors in dogs, their survival and the efficacy of surgical resection. Vet. Record. 154(24):743-746.
- **MURPHY, S.; SPARKES, A.H.; BLUNDEN, A.S.; BREARLEY, M.J.; SMITH, K.C.** 2006. Effects of stage and number of tumors on prognosis of dogs with cutaneous mast cell tumors. Vet. Record. 158(9):287-291.
- **NEWMAN, S.J.; MrKONJICH, L.; WALTER, K.K.; ROHRBACH, B.W.** 2007. Canine subcutaneous mast cell tumors: Diagnosis and Prognosis. J. Comp. Path. 136:231-239.
- **NORTHRUP, N.C.; HOWERTH, E.W.; HARMON, B.G.; BROWN, C.A.; CARMICHEAL, K.P.; GARCIA, A.P.; LATIMER, K.S.; MUNDAY, J.S., RAKICH, P.M.; RICHEY, L.J.; STEDMAN, N.L.; GIEGER, T.L.** 2005. Variation among pathologists in the histologic grading of canine cutaneous mast cell tumors with uniform use of a single grading reference. J. Vet. Diagn. Invest. 17(6):561-564.

- **OZAKI, K.; YAMAGAMI, T.; NOMURA, K.; NARAMA, L.** 2002. Mast Cell Tumors of the Gastrointestinal Tract in 39 dogs. *Vet. Pathol.* 39:557-564.
- **PATNAIK, A.K.; EHLER, W.J.; MACEWEN, E.G.** 1984. Canine cutaneous mast cell tumors: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet. Pathol.* 21(5):469-474.
- **POLYAK, K.; XIA, Y.; ZWELER, J.L.; KINZIER, K.W.; VOGELSTEIN, B.** 1997. A model for p53-induced apoptosis. *Nature* . 389:300-305.
- **PREZIOSI, R.; SARLI, G.; PALTRINIERI, M.** 2004. Prognostic value of intratumoral vessel density in cutaneous mast cell tumors of the dog. *J. Comp. Path.* 130:143-151.
- **RENEHAN, A.G.; BOOTH, C.; POTTEN, C.S.** 2001. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ.* 322:1536-1548.
- **ROGERS, K.S.** 1996. Mast cell tumors. Dilemmas of diagnosis and treatment. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 26(1):87-102.
- **ROMANSIK, E.M.; REILLY, C.M.; KASS, P.H.; MOORE, P.F.; LONDON, C.A.** 2007. Mitotic index is predictive for survival for canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 44:335-341.
- **SCASE, T.J.; EDWARDS, D.; MILLER, J.; HENLEY, W.; SMITH, K.; BLUNDEN, A.; MURPHY, S.** 2006. Canine mast cell tumors: Correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J. Vet. Intern. Med.* 20:151-158.
- **SÉGUIN, B.; LEIBMAN, N.F.; BREGAZZI, V.S.; OGILVIE, G.K.; POWERS, B.E.; DERNELL, W.S.; FETTMAN, M.J.; WITHROW, S.J.** 2001. Clinical outcome of dogs with grade II mast cell tumors treated with surgery alone: 55 cases (1996-1999). *JAVMA.* 218(7):1120-1123.
- **SÉGUIN, B.; BESANCON, M.F.; McCALLAN, J.L.; DEWE, L.L.; TENWOLDE, M.C.; WONG E.K.; KENT M.S.** 2006. Recurrence rate, clinical outcome, and cellular proliferation indices as prognostic indicators after incomplete surgical excision of cutaneous grade II mast cell tumors: 28 dogs (1994-2002). *J. Vet. Intern. Med.* 20:933-940.
- **SFILIGOI, G.; RASSNICK, K.M.; SCARLETT, J.M.; NORTHRUP, N.C.; GIEGER, T.L.** 2005. Outcome of dogs with mast cell tumors in the inguinal or perineal region versus other cutaneous locations: 124 cases (1990-2001). *JAVMA.* 226(8):1368-1374.
- **SIMOES, J.P.C.; SCHONING, P.; BUTINE, M.** 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: A comparison of three methods. *Vet. Pathol.* 31:637-647.

- **SIMPSON, A.M.; LUDWIG, L.L.; NEWMAN, S.J.; BERGMAN, P.J.; HOTTINGER, H.A.; PATNAIK, A.K.** 2004. Evaluation of surgical margins required for complete excision of cutaneous mast cell tumors in dogs. *JAVMA*. 224(2):236-240.
- **SOON LEE, C.** 1996. Differences in cell proliferation and prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen and Ki67 antigen immunoreactivity in in situ and invasive carcinomas of the extrahepatic biliary tract. **In:** American Cancer Society, 78 (9):1881-1887.
- **STREFEZZI, R.F.; XAVIER, J.G.; CATAO-DIAS, J.L.** 2003. Morphometry of canine cutaneous mast cell tumors. *Vet. Pathol.* 40:268-275.
- **THAMM, D.H.; MAULDIN, E.A.; VAIL, D.M.** 1999. Prednisone and vinblastine chemotherapy for canine mast cell tumor – 41 cases (1992-1997). *J. Vet. Intern. Med.* 13(5):491-497.
- **VAN DEURSEN, J.M.** 2007. Rb Loss Causes Cancer by Driving Mitosis Mad. *Cancer Cell.* 11:1-3.
- **WEAVER, B.A.A.; CLEVELAND, D.W.** 2005. Decoding the links between mitosis, cancer and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation and cell death. *Cancer Cell.* 8:7-12.
- **WEINBERG, R.A.** 1996. Así se produce el cáncer. *Investigación y ciencia.* pp:10-18.
- **WEISSE, C.; SHOFER, F.S.; SORENMO, K.** 2002. Recurrence rates and sites for grade II canine cutaneous mast cell tumors following complete surgical excision. *JAAHA.* 38:71-74.

ANEXOS

Protocolo 1

Metacromasia

Preparar 2 soluciones:

1.-Solución A: 0.5 mg de Azul de Toluidina disueltos en 50 ml de alcohol al 70%.

2.-Solución B: 3 gr de Cloruro de Sodio disueltos en 300 ml de agua destilada.

Preparar una solución de trabajo mezclando 5 ml de la solución A con 45 ml de la solución

B. El pH debe resultar entre 2.3 - 2.5 y una vez utilizada, debe descartarse.

Procedimiento

1.-Desparafinar las muestras y luego son embebidas en agua destilada, para sumergirlas en la solución de trabajo durante 3 min.

2.-Lavar 3 veces con agua destilada y deshidratar rápidamente pasando por alcoholes de 95% (1 lavado) y de 100% (3 lavados).

3.-Se aclaran en xiloles, un lavado de 3 min. y dos de 5 min. Finalmente se monta en Flotex.

Protocolo 2

Detección inmunohistoquímica de Apoptosis celular

1. Desparafinar los cortes histológicos.
2. Sumergir en PBS una vez por 5 minutos (min.).
3. Pre-tratar los cortes histológicos para recuperación de antígenos con proteinasa K durante 15 min.
4. Lavar con agua destilada 2 veces por 2 min.
5. Bloquear peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 5 min. a temperatura ambiente.
6. Lavar 2 veces con PBS por 5 min. cada vez.
7. Retirar el exceso de líquido para aplicar inmediatamente el amortiguador equilibrante por al menos 10 segundos a temperatura ambiente.
8. Retirar el exceso de líquido para aplicar la enzima TDT e incubar en cámara húmeda en estufa universal a 37°C por 1 hora.
9. Detener la actividad enzimática aplicando el inhibidor Working strength/buffer, se agita por 15 seg. y se incuba por 10 min. a temperatura ambiente.
10. Lavar las muestras 3 veces con PBS por 1 min. cada vez.
11. Retirar el exceso de líquido para aplicar la antidigoxigenina conjugada e incubar en cámara húmeda por 30 min. a temperatura ambiente.
12. Lavar 4 veces con PBS por 2 min. cada vez a temperatura ambiente.
13. Retirar el exceso de líquido para aplicar suficiente cantidad de peroxidasa (DAB) de manera de cubrir completamente las muestras por 3 a 6 min. a temperatura ambiente.
14. Lavar 3 veces con agua destilada por 1 min. cada vez e incubar por 5 min. a

temperatura ambiente.

15. Contrateñir las muestras con Hematoxilina de Mayer por 3 min. y lavar con agua corriente.

16. Sumergir en Carbonato de Litio por 3 min.

17. Lavar con agua corriente por 5 min.

18. Deshidratar las muestras en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 8 min. cada uno.

19. Aclarar en xiloles (3 lavados) por 3 min. cada uno.

20. Montar cubreobjeto con medio de montaje (Flotex).

Protocolo 3

Detección inmunohistoquímica de Proliferación celular

1. Desparafinar cortes histológicos:

- Sumergir las muestras en xiloles y luego en alcoholes de concentraciones descendentes (100% - 95% - 70%).

- Lavar en agua destilada por 5 min.

2. Recuperación de inmunoreactividad con calor de microondas:

- Colocar las muestras en solución de buffer citrato en compartimiento interno de vaso de recuperación, rellenar con agua destilada el compartimiento externo.

- Irradiar en horno microondas a máxima potencia hasta alcanzar 92 – 94°C por 10 min. sin muestras.

- Colocar las muestras y mantener la temperatura durante 10-20 min. utilizando la mínima potencia de irradiación del horno.

- Dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 min.

- Lavar en agua destilada por 5 min.
3. Bloqueo de peroxidasa endógena:
 - Agregar agua oxigenada al 3% en agua destilada durante 10 min. a temperatura ambiente.
 - Lavar 2 veces en agua destilada por 5 min. cada vez.
 - Lavar 1 vez con PBS por 5 min.
 4. Bloqueo de proteínas:
 - Agregar BSA al 2% en PBS durante 10 min.
 5. Incubación con anticuerpo primario:
 - Anticuerpo monoclonal de ratón anti-PCNA humano (Sigma Chemical P-8825 Alemania) diluído 1:1500 en PBS más BSA durante toda la noche a 4°C.
 - Se usarán controles negativos para la reacción inmunohistoquímica mediante la incubación de los cortes con suero normal de ratón en lugar del anticuerpo monoclonal.
 6. Sacar las muestras a temperatura ambiente por 30 min.
 7. Lavado con PBS 3 veces por 5 min. cada uno.
 8. Incubación con anticuerpo secundario:
 - Anticuerpo biotinilado de conejo anti Ig de ratón (Dako E 0354 Dinamarca) diluído 1:200 en PBS más BSA durante 60 min. a temperatura ambiente.
 9. Lavado con PBS 3 veces por 5 min. cada uno.
 10. Incubación con conjugado Estreptavidina/peroxidasa (Chemicon SA202 Australia) diluído 1:200 en PBS más BSA durante 60 min. a temperatura ambiente.
 11. Lavado con PBS 3 veces por 5 min. cada uno.
 12. Revelado con DAB (Dako K3466 Dinamarca) durante 3-5 min.
 13. Lavado con PBS 1 vez y luego 2 lavados con agua destilada por 5 min. cada uno.

14. Contra tinción con Hematoxilina de Mayer:

- Sumergir en hematoxilina.
- Lavado con agua corriente.
- Sumergir en Carbonato de litio durante 2 min.
- Lavado con agua corriente.

15. Deshidratar, aclarar y montar:

- Deshidratar las muestras en alcoholes de 96% (1 lavado) y de 100% (3 lavados) por 5 min. cada uno.

- Aclarar en xiloles (3 lavados) por 5 min. cada uno.
- Montar cubreobjeto con un medio de montaje (Flotex).