



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Trabajo Final presentado para optar al grado de Médico
Veterinario.

Modalidad: Práctica Pre-profesional

Estudio Histopatológico del Mastocitoma Cutáneo Canino.

Alumno: Caverzán, Matías Daniel

DNI: 36.669.089

Director: MSc. Bagnis, Guillermo

Co-director: Dr. Martínez, Ramiro Andrés

Río Cuarto- Córdoba

Abril de 2019

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final: Estudio Histopatológico del Mastocitoma Cutáneo Canino.

Autor: Caverzán, Matías Daniel.
DNI: 36.669.089

Director: Bagnis Guillermo
Co-Director: Martínez, Ramiro

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión Evaluadora:

Med Vet MSc Raul Yaciuk _____

Med Vet Dra Romanini Silvia _____

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretaria Académica

DEDICATORIA

A mi madre; Alicia H., porque sus brazos siempre se abren cuando necesito un abrazo. Su amor, su fuerza y sus palabras de aliento siempre me han dirigido por la vida y me han dado las alas que necesitaba para volar.

A mi padre; Daniel C., porque sus consejos me ayudan a tomar las decisiones correctas, porque tu esfuerzo incesante ha hecho que no me falte nada y porque tu amor me ha enseñado que todo es posible.

A mi querido Adrián Alcoba, que hoy está más que presente, porque nunca dudó en bríndame sus conocimientos y alentarme a ser mejor.

AGRADECIMIENTOS

A mis grandes profesores; Guillermo Bagnis quién con gran predisposición, apoyo, y horas de mates compartidos me enseñó a descubrir una historia en cada histopatología, y Adrián Alcoba, por transmitirme un poco de su vasta experiencia y enseñarme que cada paciente merece su mejor oportunidad.

A la cátedra de Patología General; Silvia R., Judith B., Raúl Y., Ana C., Guillermo B., que me ayudaron a transitar este camino, por el cual me brindaron innumerables conocimientos y, por sobre todo, grandes valores.

A Vivian M., por su predisposición absoluta y el apoyo en cada instante.

A Nelcy S. y Analía C. por su cariño, por enseñarme y ayudarme a introducirme en el Laboratorio de Patología.

A mis amigos/as, por cada instante compartido en distintas etapas, por años inolvidables y por los que vendrán.

Al equipo de Veterinaria San Antonio; M. Marta S., Marina R., Nerina B., Sabina R., Amanda G., Francisco A., por abrirme las puertas y darme el lugar a crecer profesionalmente.

Nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido. Ahora es el momento de comprender más, para temer menos.

Marie Curie

INDICE

Introducción	11
Marco teórico	16
Histología de la Piel	16
Mastocitos	24
Biología Tumoral	28
Metástasis	39
Nicho Metastásico	42
Respuesta Inmune a las Neoplasias	50
Mastocitomas	56
Mastocitomas y Marcadores Moleculares	64
Tratamientos	66
Clasificación de las Neoplasias	68
Manejo de Muestras	70
Objetivos	72
Objetivos generales	73
Materiales y métodos	74
Resultados y discusión	77
Conclusiones	92
Bibliográficas	94

INDICE DE FOTOGRAFIAS

Figura n°1	17
Figura n°2	18
Figura n°3	22
Figura n°4	23
Figura °5	24
Figura n°6	35
Figura n°7	40
Figura n°8	57
Figura n°9	58
Figura n°10	59
Figura n°11	62
Figura n° 12	63
Figura n°13	85
Figura n°14	86
Figura n°15	87
Figura n°16	88
Figura n°17	89
Figura n°18	90
Figura n°19	91

Gráfico n°1	78
Gráfico n°2	79
Gráfico n°3	80
Gráfico n°4	81
Gráfico n°5	82
Gráfico n°6	83
Gráfico n°7	84

RESUMEN

El cáncer es un problema común en la práctica veterinaria de pequeños animales. Debido a los grandes avances en equipamiento de las clínicas veterinarias en investigaciones sobre las causas de las enfermedades caninas y felinas, el diagnóstico de las neoplasias es cada vez más frecuente.

La piel y los tejidos blandos son los sitios más comunes de desarrollo tumoral, y se ha evidenciado que dentro de los tumores más prevalentes en piel se encuentran los mastocitomas. Estos tumores han sido muy evaluados por diversos patólogos, existiendo en consecuencia distintos modelos para la clasificación histopatológica, la cual es una herramienta de gran valor para los clínicos para realizar tratamientos adecuados.

El siguiente estudio retrospectivo analiza y clasifica diversas muestras de tejidos neoplásicos previamente diagnosticados como mastocitomas, que han sido procesados en los laboratorios de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto y el laboratorio privado LAIVET, siguiendo los modelos de clasificación de Patnaik y Kiupel.

Palabras claves: Cáncer, Mastocitoma, Histopatología, Patnaik, Kiupel

SUMMARY

Cancer is a common problem in the veterinary practice of small animals. Due to the great advances in both the equipment of veterinary clinics and the research on the causes of canine and feline diseases, the diagnosis of neoplasms increasingly frequent.

The skin and soft tissues are the most common sites of tumor development, and it has been demonstrated that mastocytomas are among the most prevalent skin tumors. These tumors have been highly evaluated by various pathologists, and there are different models for histopathological classification, which is a valuable tool for clinicians to perform appropriate treatments.

The following retrospective study aims to analyze and classify various samples of neoplastic tissues previously diagnosed as mastocytomas, which have been processed in the laboratories of Animal Pathology of the National University of Rio Cuarto and the laboratory private veterinary LAIVET, following Patnaik and Kiupel classification models.

Keywords: Cancer, Mastocytoma, Histopathology, Patnaik, Kiupel.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La neoplasia es un problema común en la práctica veterinaria de pequeños animales, siendo el diagnóstico de las mismas cada vez más frecuente. El término neoplasia se refiere a una masa anormal de tejido que es independiente del control de crecimiento que se ejerce en los tejidos y células del organismo. Los términos neoplasia y tumor son empleados indistintamente para indicar crecimientos benignos o malignos y por tal motivo son erróneamente equiparados como sinónimos a pesar de que el término tumor es más ambiguo debido a que sólo indica cualquier masa localizada de tejido (Camacho, 2001). El término cancer se utiliza para referirse a las neoplasias malignas ya sea que se trate de un carcinoma si el tejido es de origen epitelial o de un sarcoma si el tejido es de origen mesenquimático.

Por consiguiente, podemos definir que un tumor maligno es una enorme agregación de células cancerosas descendientes de una célula fundadora aislada. Esta célula inicial que le dio origen antes era una célula de funcionamiento normal. De alguna manera experimenta un cambio fundamental en el cual comienza a dividirse y proliferar en forma autónoma con independencia de la respuesta a los estímulos externos que son necesarios para el crecimiento celular. De esta manera, la célula origina millones de otras células igualmente alteradas que constituyen la masa tumoral. Estos pasos de transformación y proliferación no suelen estar bien definidos debido a la dificultad de estudiar la evolución de un cáncer natural en el paciente individual. Un concepto importante que es universalmente aceptado, es que el cancer es una enfermedad genética, aunque no es siempre hereditario. Las células neoplásicas difieren de las normales porque muestran proliferación incontrolada independiente del requerimiento de nuevas células, dificultad en la diferenciación celular, alteración en la comunicación y adherencia celular. Los genes específicos pueden estar activados (conocidos como oncogenes), o estar inactivados (genes supresores de tumores), o tener su nivel de expresión alterado.

Los cambios genéticos pueden ocurrir en las líneas celulares germinales y por lo tanto estar presentes en todas las células del cuerpo en el momento del nacimiento o, mucho más común, pueden ocurrir en forma espontánea en células somáticas como parte del proceso de envejecimiento. El acúmulo de mutaciones espontáneas ocurre con bastante lentitud, pero a menudo hay factores externos que aceleran la velocidad de acumulación, pudiendo estos ser factores biológicos, físicos o químicos. Debido a que la piel es el órgano más grande y fácilmente observable del cuerpo, no debe sorprender que los tumores de piel sean las neoplasias más comunes en el perro y el gato. Por su estructura compleja, es factible que se produzcan una gran variedad de tumores en la piel, además del posible desarrollo de tumores secundarios (metastásicos).

Los tumores cutáneos representan alrededor de un tercio de todos los tumores caninos (Morris y Dobson, 2002). La piel comprende dos estratos; la epidermis (epitelio escamoso estratificado) y la dermis (tejido conectivo laxo). Además, cuenta con glándulas sebáceas y sudoríparas, como así también con folículos pilosos. Éstas en conjunto conforman estructuras anexas de la piel. Cabe señalar que también se presentan melanocitos, histiocitos y mastocitos dérmicos. Cualquiera de estos tejidos y células pueden dar lugar al inicio de neoplasias benignas o malignas.

Dentro de las diversas neoplasias que pueden desarrollarse en la piel de los caninos, se destaca la importancia que han tomado las mastocitomas, tumor originado de las células denominadas mastocitos, labrocitos o bien células cebadas. Aunque el mayor número de células mastocíticas se localizan en el pulmón y tracto gastrointestinal, el crecimiento tumoral de este tipo es con frecuencia en dermis y tejido subcutáneo. Es infrecuente la presentación en otros sitios como crecimiento primario, pero se ha reportado en cavidad oral, nasofaringe y laringe (Patnaik *et al.*, 1984; Pollack *et al.*, 1991). La diseminación visceral que involucra hígado y bazo es considerado por lo general un evento metastásico de tumores agresivos de ubicación dérmica o subcutánea (O'Keefe *et al.*, 1987). Existen varios estudios en los que los hallazgos indicaron que la piel y los tejidos blandos son los sitios más comunes de desarrollo tumoral, seguidos por la glándula mamaria, los tejidos hematopoyéticos (incluyendo los linfoides), el aparato urogenital, los órganos endocrinos, el tubo alimentario y la orofaringe (Becerra, 2014).

El pronóstico de las neoplasias dependerá del comportamiento biológico y estadio de la enfermedad. El examen histopatológico constituye un método diagnóstico confiable, permitiendo la tipificación y la gradación del tumor, teniendo en cuenta diversos factores como infiltración vascular, grado de pleomorfismo, índice mitótico, necrosis y compromiso de la pieza quirúrgica. Para la mayoría de los tumores el tratamiento de elección es la cirugía precoz, aunque en algunos casos el uso de quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinámica, inmunoterapia, pueden estar indicados.

Los mastocitos son células hematopoyéticas con origen en la médula ósea (a partir de células pluripotenciales CD34+), se distribuyen a los tejidos por vía sanguínea, donde adquieren gránulos citoplasmáticos y culminan su diferenciación (Paz *et al.*, 2005). Los mastocitos maduros suelen observarse en el tejido conectivo de todos los tejidos, siendo especialmente abundantes por debajo de las superficies epiteliales (Lemarié *et al.*, 1995) y también en aquellos tejidos que tienen contacto con antígenos externos (piel, aparato respiratorio y digestivo) (Tellado, 2016). Estas células son por lo general de forma redondeada y su tamaño puede alcanzar tres veces el de un polimorfonuclear neutrófilo. Posee un núcleo oval o

redondo basofílico y de posición central o paracentral, el citoplasma cuenta con numerosos gránulos que almacenan sustancias que caracterizan la función de estas células. Las células cebadas juegan un papel importante en la iniciación de la respuesta inmune, interviniendo en la migración y activación de neutrófilos, así como en reacciones de hipersensibilidad. Las células cebadas maduras presentan gránulos citoplasmáticos que contienen mediadores bioactivos.

Como bien se sabe los tumores de células cebadas tienen un comportamiento biológico que varía ampliamente. Es por esto que la clasificación histopatológica se torna una herramienta pronóstica muy importante. Varios sistemas de clasificación se han propuesto, y entre ellos la clasificación de Patnaik es la más utilizada (Moulton, 1990; Patnaik *et al.*, 1984). El sistema de Patnaik clasifica dichos tumores en tres grados según las características histológicas que incluyen celularidad, morfología celular, invasividad, actividad mitótica y reacción estromal. De acuerdo a esta clasificación, los mastocitomas bien diferenciados (grado I) llevan un excelente pronóstico a largo plazo, mientras que los mal diferenciados (grado III) son localmente invasivos y tienen más probabilidades de realizar metástasis, por lo que no solo se recomienda la cirugía sino también la quimioterapia. Por el contrario, el comportamiento de los mastocitomas intermedios (grado II) es más difícil de predecir. La mayoría de los grados II son resueltos mediante cirugía, pero entre un 5 a 22% realizan metástasis (Sabattini *et al.*, 2015).

Es por esto que para mejorar la concordancia entre patólogos y reducir así la incertidumbre pronóstica del grado intermedio del sistema de Patnaik, Kiupel propuso un sistema de clasificación histológica de dos niveles (Kiupel *et al.*, 2011). Según este nuevo sistema, el diagnóstico de un Mastocitoma de alto grado se caracteriza por tener cualquiera de los siguientes criterios: al menos siete figuras mitóticas en diez campos de alta resolución, al menos tres células multinucleadas en diez campos de alta resolución, al menos tres núcleos extraños en diez campos de alta resolución y cariomegalia. Todos otros tumores se consideran de bajo grado.

Cabe señalar que dentro del diagnóstico de los mastocitomas, puede contarse con una herramienta que tiene como base la inmunohistología.

Poco se sabe acerca de la sobrevida en los casos presentes en nuestra región.

Según la bibliografía consultada, el mastocitoma canino es el tumor cutáneo más frecuente en perros, con una incidencia del 20 al 25% de los tumores cutáneos y subcutáneos (Bostock, 1973). Estudios anteriores (Redondo *et al.*, 2011) corroboran estos datos en nuestra zona de influencia. Las razas braquiocefálicas tienen predisposición a desarrollar este tipo de tumores. El Bóxer tiene más riesgo de padecer este tumor, pero suelen desarrollar formas

bien diferenciadas y múltiples, por lo que en esta raza suelen tener buen pronóstico (Tellado, 2016). El Pug y el Sharpei suelen tener mastocitomas muy agresivos, con una forma de presentación difusa en la que los límites de la lesión no son precisos. Es más frecuente la presentación en perros de edad avanzada, aunque puede generarse en ejemplares jóvenes con menor frecuencia. El porcentaje de sobrevida citado en la literatura consultada es muy bajo, siendo de 51 semanas en los tumores más diferenciados, 28 semanas en los intermedios y en los más indiferenciados 18 semanas. En nuestra región, estos datos no han sido contrastados debido a la complejidad en el seguimiento de los casos. Los tratamientos son discutidos y los resultados variables, aunque en general son poco eficaces. Tampoco están claros los factores que podrían condicionar la aparición de dicha patología. Se ha demostrado la presencia de una posible etiología viral, pero no se descartan otras causas (Miller *et al.*, 2002).

MARCO TEÓRICO

HISTOLOGÍA DE LA PIEL

La piel y sus derivados constituyen el tegumento. La piel forma la cubierta externa del cuerpo y es su órgano más grande dado que representa del 15 al 20% de su masa total. Está constituida por dos estratos principales:

La **epidermis**, compuesta por un epitelio estratificado plano queratinizado que crece constantemente pero mantiene su espesor normal por el proceso de descamación. La epidermis deriva del ectodermo.

La **dermis**, compuesta por un tejido conjuntivo denso que provee sostén mecánico, resistencia y espesor de piel. Deriva del mesodermo.

La hipodermis contiene una cantidad variable de tejido adiposo organizado en lobulillos separados por tabiques de tejido conjuntivo. Está situada a mayor profundidad que la dermis y equivale al tejido celular subcutáneo.

Los derivados epidérmicos de la piel comprenden estructuras y productos como:

- Folículos pilosos y pelo
- Glándulas sudoríparas
- Glándulas sebáceas
- Uñas
- Glándulas mamarias.

La piel y sus anexos forman un órgano complejo (*figura 1*) compuestos por muchos tipos diferentes de células cuya diversidad y capacidad de actuar en conjunto proveen una serie de funciones que permiten que los individuos se enfrenten al medio externo.

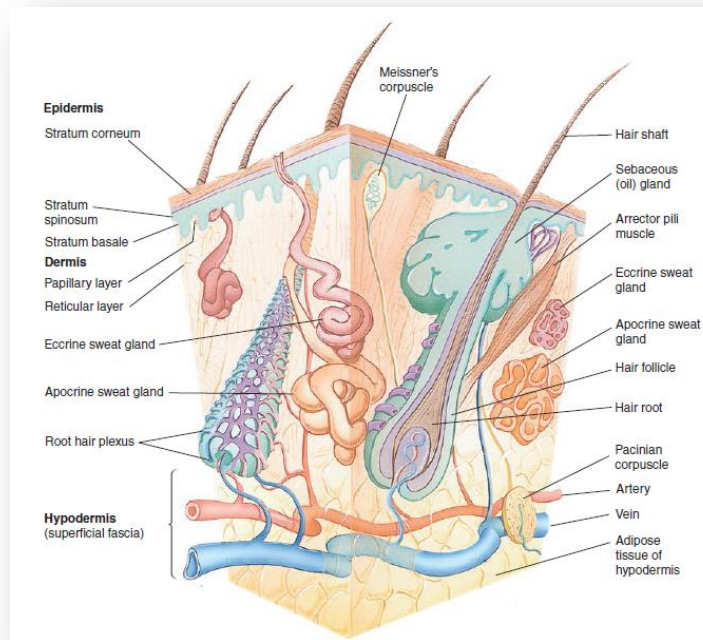


Figura 1: diagrama que ilustra los diferentes componentes del tegumento. Se pueden evidenciar ambos estratos; epidermis y dermis. Así mismo, se aprecia un corte longitudinal de un folículo piloso, que es acompañado por las glándulas sebáceas y sudoríparas. En la profundidad, se encuentra la hipodermis, donde se alojan los vasos sanguíneos que irrigan la piel. (Weiss, 1988)

Las funciones principales de la piel son:

- Actuar como una barrera de protección contra agentes físicos, químicos y biológicos del medio externo.
- Proveer información inmunológica obtenida durante el procesamiento antigénico a las células efectoras adecuadas del tejido linfático.
- Participar en la homeostasis al regular la temperatura corporal y la pérdida de agua.
- Transmitir información sensitiva acerca del medio externo al sistema nervioso.
- Desempeñar funciones endócrinas al secretar hormonas, citosinas y factores de crecimiento y al convertir moléculas precursoras en moléculas maduras con actividad hormonal (vitamina D)
- Intervenir en la excreción a través de la secreción exócrina de las glándulas sudoríparas eccrinas y apocrinas y de las glándulas sebáceas.

EPIDERMIS

Está compuesta por un epitelio estratificado plano en el que pueden identificarse cuatro estratos bien definidos, siendo los siguientes, desde la profundidad hacia la superficie: (figura 2)

- **Estrato basal**, también llamado estrato germinativo por la presencia de células con actividad mitótica, que son las células madres de la epidermis.
- **Estrato espinoso**, también llamado estrato de células espinosas por el aspecto microscópico óptico característico de sus componentes celulares con proyecciones cortas que se extienden de una célula a otra.
- **Estrato granuloso**, cuyas células contienen gránulos abundantes que se tiñen intensamente.
- **Estrato lúcido**, limitado a la piel gruesa y considerado una subdivisión del estrato córneo.
- **Estrato córneo**, compuesto por células queratinizadas.

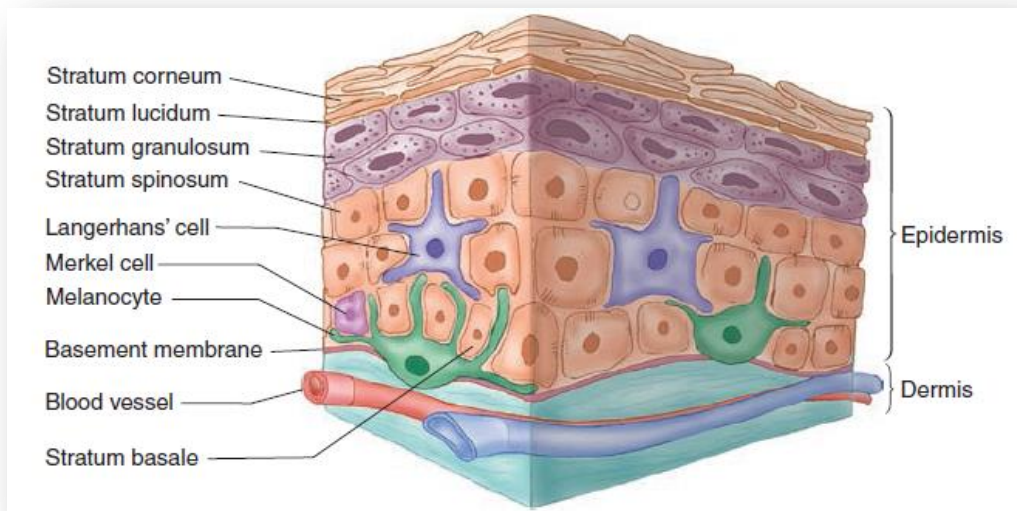


Figura 2: diagrama que ilustra los distintos estratos correspondientes a la epidermis; pudiéndose diferenciar desde la parte más externa hacia el interior: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinoso y estrato basal. Entre el estrato espinoso se encuentran otras células fundamentales como las células de Langerhans, melanocitos, y células de Merkel. (Weiss, 1988)

El estrato basal consiste en una capa celular de una sólo célula de espesor que se apoya sobre la lámina basal (figura 4). Posee las células madre que dan origen a células nuevas, los queratinocitos, por división mitótica. Las células son pequeñas y cúbicas o cilíndricas bajas. Tienen una cantidad menor de citoplasma que las células del estrato que está por encima; en

consecuencia, sus núcleos están más juntos. La disposición de los núcleos, en combinación con el citoplasma basófilo de estas células, imparte una basofilia pronunciada al estrato basal. Las células basales también contienen en su citoplasma cantidades variables de melanina que se transfiere desde los melanocitos vecinos dispersos en este estrato celular. Conforme se originan por división mitótica en este estrato, los queratinocitos nuevos se desplazan hacia el estrato siguiente, con lo que inician su proceso de migración hacia la superficie. Este proceso termina cuando la célula se convierte en una célula queratinizada madura que al final se descama de la superficie de la piel.

El estrato espinoso tiene por lo menos varias células de espesor (*figura 4*). Sus células son más grandes que las del estrato basal y las múltiples proyecciones citoplasmáticas o “espinas” que poseen le dan su nombre a este estrato. Las proyecciones citoplasmáticas están unidas a proyecciones similares de células contiguas por medio de desmosomas. Con el microscopio óptico el sitio donde se encuentra el desmosoma aparece como un engrosamiento pequeño denominado nodo de Bizzozero. Conforme maduran y se desplazan hacia la superficie las células aumentan de tamaño y se adelgazan en un plano paralelo al superficial. Esta disposición es particularmente notable en las células espinosas más superficiales, cuyos núcleos también se alargan en lugar de ser ovoides para adecuarse a la forma aplanada que han adquirido las células.

El estrato granuloso, la capa más superficial de la porción no queratinizada de la epidermis, tiene de una a tres células de espesor (*figura 4*). Las células poseen numerosos gránulos de queratohialina, de allí el nombre de este estrato. Los gránulos contienen proteínas con abundancia de cistina e histidina, que son las precursoras de la proteína filagrina que aglomera los filamentos de queratina presentes dentro de las células cornificadas del estrato córneo. Los gránulos de queratohialina son de forma irregular y de tamaño variable. A causa de su basofilia intensa se identifican con facilidad en los cortes histológicos de rutina.

Por lo general hay una transición brusca entre las células nucleadas del estrato granuloso y las células anucleadas, planas y desecadas del estrato córneo. Las células del estrato córneo son las más diferenciadas de la epidermis. Pierden su núcleo y sus orgánulos citoplasmáticos y se llenan casi por completo de filamentos de queratina. La gruesa membrana plasmática de estas células queratinizadas cornificadas está cubierta por fuera, en la porción más profunda de este estrato, por una capa extracelular de lípidos que forman el componente principal de la barrera contra el agua en la epidermis.

DERMIS

En los cortes de piel perpendiculares a la superficie pueden observarse evaginaciones digitiformes de tejido conjuntivo, llamadas papilas dérmicas, que empujan la parte profunda de la epidermis. Las papilas se complementan con las que parecen ser proyecciones similares de la epidermis, llamadas crestas epidérmicas o redes de crestas epidérmicas, que se hunden en la dermis.

La inspección del espesor de la dermis, permite identificar dos capas de estructura bien definida:

La **dermis papilar**, la más superficial, consiste en tejido conjuntivo laxo ubicado justo debajo de la epidermis. Los haces de fibras colágenas de esta parte de la dermis no son tan gruesos como los de la porción más profunda. Esta red colágena contiene en forma predominante moléculas de colágeno de tipo I y de tipo III. De modo similar, las fibras elásticas son filiformes y se organizan en una red irregular. La dermis papilar es relativamente delgada e incluye la sustancia de las papilas y las crestas dérmicas. Contiene vasos sanguíneos que irrigan la epidermis pero no se introducen en ella. También contiene prolongaciones nerviosas que terminan en la dermis o perforan la lámina basal para introducirse en el compartimento epitelial.

La **dermis reticular** es profunda con respecto a la dermis papilar. Aunque su espesor varía en diferentes partes de la superficie corporal, siempre es bastante más gruesa y contiene menos células que la dermis papilar. Se caracteriza por tener gruesos haces irregulares de fibras colágenas sobre todo de tipo I y fibras elásticas mucho menos delicadas. Estas fibras colágenas y elásticas no están orientadas al azar sino que forman las líneas regulares de tensión de la piel que se conocen con el nombre de líneas de Langer.

CÉLULAS DE LA EPIDERMIS

Las células de la epidermis pertenecen a cuatro tipos celulares diferentes:

- Queratinocitos
- Melanocitos
- Células de Langerhans
- Células de Merkel

El **queratinocito** es el tipo celular predominante de la epidermis. Estas células se originan en el estrato epidérmico basal. Al abandonar este estrato los queratinocitos pasan a cumplir dos actividades esenciales: a) producen queratina, la principal proteína estructural de la epidermis. La queratina constituye casi el 85% de los queratinocitos diferenciados por completo; b) participan en la formación de la barrera contra el agua de la epidermis.

Los queratinocitos del estrato basal contienen abundantes ribosomas libres, filamentos intermedios (de queratina) de 7 a 9 nm dispersos, un aparato de Golgi pequeño, mitocondrias y retículo endoplásmico rugoso (RER). El citoplasma de los queratinocitos inmaduros aparece basófilo en los cortes histológicos a causa de la gran cantidad de ribosomas libres, la mayoría de los cuales se ocupan de la síntesis de la queratina que luego se ensambla en los filamentos de queratina.

En la parte más superficial del estrato espinoso los ribosomas libres dentro de los queratinocitos comienzan a sintetizar gránulos de queratohialina que se convierten en la característica distintiva de las células del estrato granuloso. Los gránulos de queratohialina contienen las dos proteínas principales asociadas con los filamentos intermedios; la filagrina y la tricohialina. Conforme aumenta la cantidad de gránulos el contenido de estos se libera hacia el citoplasma del queratinocito. La filagrina y la tricohialina funcionan como promotoras de la aglomeración de los filamentos de queratina en tonofibrillas, lo que inicia la conversión de las células granulosas en células cornificadas. Este proceso recibe el nombre de queratinización y ocurre en 2 a 6 horas, el tiempo que tardan las células en abandonar el estrato granuloso y entrar en el estrato córneo. Las fibrillas de queratina que se forman en este proceso son de queratina blanda, a diferencia de la queratina dura del pelo y las uñas.

La transformación de una célula granulosa en una célula cornificada también comprende la desintegración del núcleo y otros orgánulos y el engrosamiento de la membrana plasmática. Por último, las células se descaman con regularidad de la superficie del estrato córneo.

Cuando los queratinocitos del estrato espinoso comienzan a producir gránulos de queratohialina también producen unas vesículas limitadas por membrana que reciben el nombre de cuerpos laminares. Las células espinosas y granulosas sintetizan una mezcla heterogénea de glucoesfingolípidos, fosfolípidos y ceramidas; esta mezcla pasa al interior de los cuerpos laminares que se forman en el aparato de Golgi. Luego el contenido de los gránulos se secreta por exocitosis hacia el espacio intercelular entre el estrato granuloso y el estrato córneo. La formación de la barrera contra el agua en la epidermis es producto de la organización que tienen estas láminas lipídicas intercelulares.

Los **melanocitos** son células dendríticas que están dispersas entre las células del estrato basal (*figura 3*). Se denominan células dendríticas porque el cuerpo celular redondeado que se sitúa en el estrato basal emite prolongaciones largas entre los queratinocitos del estrato espinoso. Ni las prolongaciones ni el cuerpo celular establecen uniones desmosómicas con los queratinocitos vecinos. No obstante, los melanocitos que están cerca de la lámina basal poseen estructuras semejantes a hemidesmosomas. La relación de melanocitos:queratinocitos

o sus precursores en el estrato basal varía de 1:4 a 1:10 en diferentes partes del cuerpo y es constante en todas las razas. En los cortes de rutina teñidos con hematoxilina y eosina los melanocitos se ven en el estrato basal como células con núcleos alargados que están rodeados de un citoplasma claro. Estas células conservan la capacidad de replicarse durante toda su vida, aunque a un ritmo mucho más lento que los queratinocitos, con lo que se mantiene la unidad melanoepidérmica.

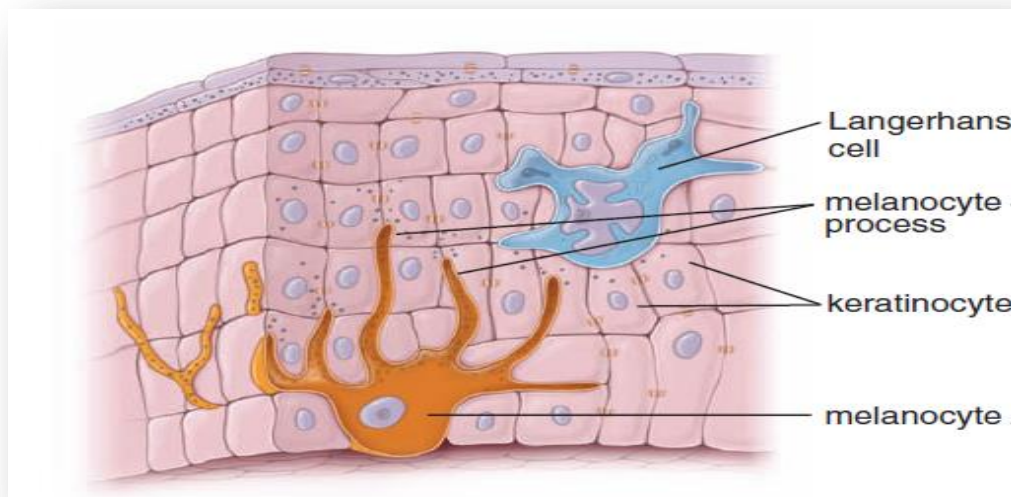


Figura 3: este diagrama muestra la interacción de un melanocito con varias células del estrato basal y espinoso. El malonocito posee largas prolongaciones dendríticas que contienen melanosomas acumulados y se extienden entre las células de la epidermis. (Weiss, 1988)

Los melanocitos epidérmicos producen y secretan la melanina, un pigmento que tiene como función más importante la de proteger el organismo de los efectos deletéreos de la irradiación ultravioleta no ionizante. Los melanosomas en desarrollo y su contenido de melanina se transfieren a los queratinocitos vecinos por donación pigmentaria. Este proceso, comprende la fagocitosis del extremo de la prolongación melanocítica por el queratinocito, es un tipo de secreción citocrina porque también se fagocita una pequeña cantidad de citoplasma alrededor del melanosoma.

Las **células de Langerhans** son células presentadoras de antígenos de aspecto dendrítico que están en la epidermis y que captan y presentan antígenos que entran a través de la piel. Estas células no pueden distinguirse a ciencia cierta en los cortes de hematoxilina y eosina. De la misma forma que los melanocitos, las células de Langerhans no establecen uniones

desmosómicas con los queratinocitos vecinos. Al igual que los macrófagos, estas células expresan moléculas del MHC I y del MHC II, así como receptores de Fc para la inmunoglobulina G (IgG). Así mismo, expresan receptores para el componente C3b del complemento y cantidades fluctuantes de moléculas CD1a. En su papel de célula presentadora de antígenos la célula de Langerhans participa en las reacciones de hipersensibilidad retardada a través de la captación de antígenos en la piel y su transporte hacia los linfonódulos.

Las **células de Merkel** son células epidérmicas modificadas que se encuentran localizadas en el estrato basal. Son muy abundantes en la piel donde la percepción sensorial es aguda.

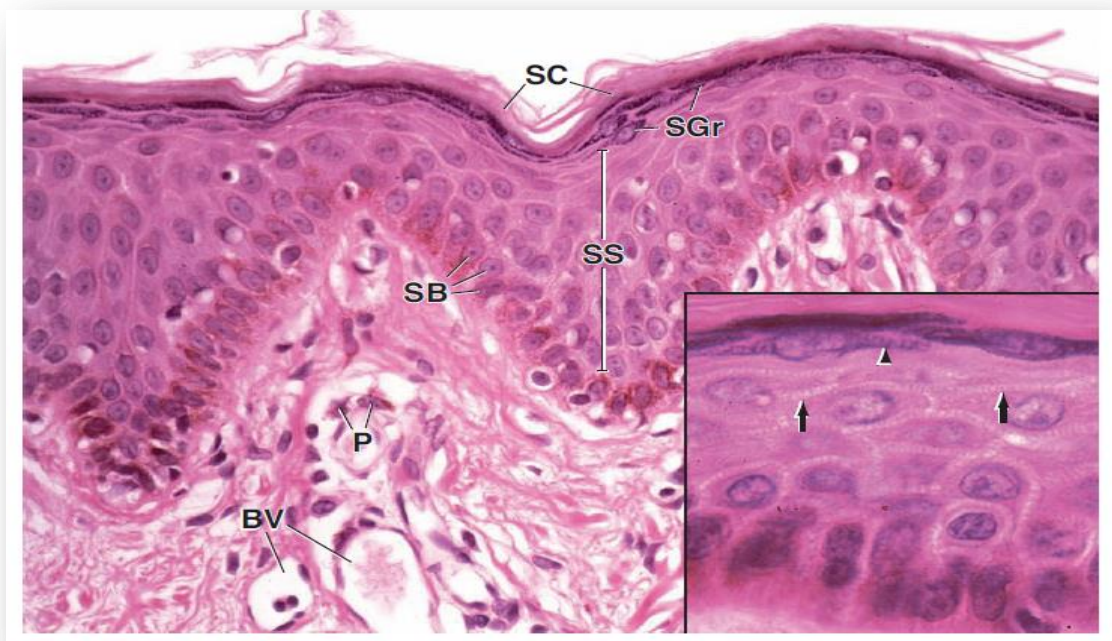
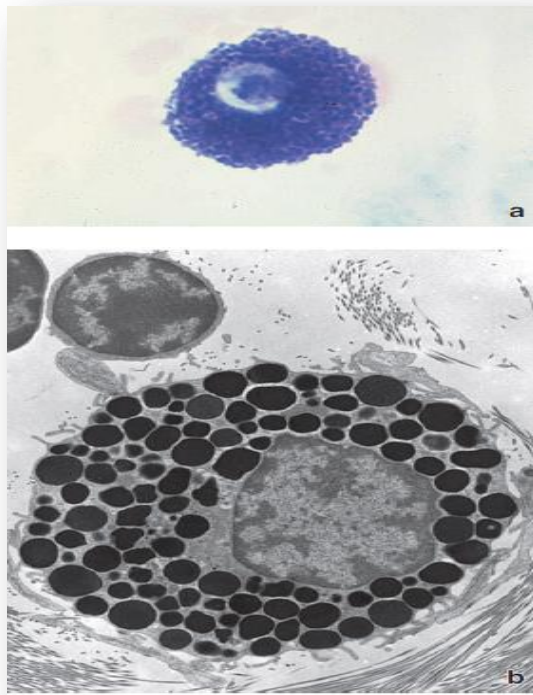


Figura 4: en esta microfotografía de 400x se muestran las capas de la epidermis. La capa celular que ocupa el sitio más profundo es el estrato basal (SB). Tiene una sola célula de espesor. Por encima hay una capa de varias células de espesor que se denomina estrato espinoso (SS). Está formado por células que tienen proyecciones que aparentan “espinas” en su superficie. Estas proyecciones entran en contacto con las “espinas” de células vecinas y, juntas, se ven como puentes intercelulares (flechas, detalle). La capa siguiente es el estrato granuloso (SGr), cuyas células contienen gránulos de queratohialina (puntas de flecha, detalle). En la superficie se halla el estrato córneo (SC), que está compuesto por células queratinizadas, células que ya no poseen núcleo. (Weiss, 1998)

MASTOCITOS

Los mastocitos son células del tejido conjuntivo grandes y ovoides (20 a 30 μm de diámetro) con un núcleo esférico y un citoplasma repleto de gránulos voluminosos y muy basófilos (*figura 5*). Los gránulos de los mastocitos pueden ser puestos en evidencia con colorantes básicos como el azul de toluidina que, como contienen heparina, un glucosaminoglucano muy sulfatado, los tiñe en forma intensa y metacromática. El mastocito



está emparentado con el basófilo, una célula de la sangre que contiene gránulos semejantes, pero no es idéntico a él. Los mastocitos tienen su origen en una célula madre pluripotencial (CD34+) de la médula ósea y circulan en la sangre periférica en la forma de células agranulares de aspecto monocítico. Después de migrar al tejido conjuntivo estos mastocitos inmaduros se diferencian y producen sus gránulos característicos. La superficie celular posee abundancia de microvellosidades y pliegues.

Figura 5: a. Microfotografía de un mastocito teñido con H-E. Los gránulos se tiñen intensamente y, por su gran cantidad, tienden a aparecer como un conjunto macizo en algunos sitios. La región pálida corresponde al núcleo de la célula. 1250x. *b.* Microfotografía electrónica muestra el citoplasma de un mastocito prácticamente repleto de gránulos. (Weiss, 1998)

El citoplasma contiene pequeñas cantidades de RER, mitocondrias y un aparato de Golgi. Los avances en biología molecular, biotecnología, e inmunohistoquímica, han permitido el entendimiento de la función del mastocito (Gilfillan *et al.*, 2011). El mastocito desempeña diversos procesos, que favorecen la homeostasis o generan fenómenos patológicos (Weller *et al.*, 2011). Dentro del papel en la homeostasis se mencionan: actividad inmunomoduladora, reparación de tejidos lesionados, crecimiento piloso, remodelación ósea, además intervienen

en inmunoreacciones enfocadas a destrucción de parásitos y bacterias por activación del complemento. (Urb y Sheppard, 2012).

Los mastocitos liberan sus gránulos al ser estimulados de manera adecuada, como cuando un animal o persona se exponen a un antígeno al que ya está sensibilizado. La sensibilización aparece después del encuentro inicial con un antígeno. Durante ese primer encuentro el sistema inmunitario reconoce el antígeno como “no propio”. Las células del sistema inmunitario que expresan en su superficie moléculas de anticuerpo específicas contra el antígeno proliferan y se diferencian en células secretoras de anticuerpo especializadas que se llaman plasmocitos. Estos plasmocitos producen los anticuerpos contra el antígeno. Son varias las clases principales de anticuerpos, denominados inmunoglobulinas, que se producen. Las inmunoglobulinas de la clase IgE, que son específicas contra antígenos individuales, son secretadas por los plasmocitos y se unen a receptores de Fc que están localizados en la membrana plasmática de los mastocitos. Durante una exposición ulterior al mismo antígeno en la superficie del mastocito se produce una reacción antígeno-anticuerpo que desencadena la liberación de los gránulos contenidos en el citoplasma de la célula.

Dentro de los gránulos de los mastocitos hay varias sustancias:

Histamina, que aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos de pequeño calibre y por eso causa edema de los tejidos circundantes y una reacción cutánea delatada por prurito. Además, esta sustancia aumenta la producción de moco en el árbol bronquial y desencadena la contracción del músculo liso de las vías aéreas pulmonares.

Heparina, un glucosaminoglucano sulfatado que es anticoagulante. Su expresión se limita esencialmente a los gránulos de los mastocitos y los basófilos. Cuando se unen a la antitrombina III y el factor plaquetario IV puede bloquear numerosos factores de la coagulación. También interacciona con el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y su receptor para inducir la transducción de señales en las células.

Leucotrienos C (LTC₄), D (LTD₄) y E (LTE₄), que pertenecen a una familia de lípidos modificados conjugados con glucatión (LTC₄) o cisteína (LTD₄ y LTE₄). Durante la anafilaxia los mastocitos liberan una mezcla de LTC₄, LTD₄ y LTE₄ que anteriormente se conocían con el nombre de sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A). Al igual que la histamina, los leucotrienos desencadenan la contracción prolongada del músculo liso en las vías aéreas pulmonares, lo que provoca broncoespasmo. Sin embargo, esta contracción no puede revertirse mediante el tratamiento con agentes antihistamínicos.

Factor quimiotáctico para los eosinófilos (ECF) y factor quimiotáctico para los neutrófilos (NCF), que atraen eosinófilos y neutrófilos hacia el sitio de la inflamación. Las secreciones de los eosinófilos contrarrestan los efectos de la histamina y los leucotrienos.

Serinoproteasas (triptasa y quimasa). La triptasa se concentra en forma selectiva dentro de los gránulos de secreción de los mastocitos, pero no en los basófilos. Se libera de los mastocitos junto con la histamina y sirve como marcador de la activación mastocítica. La quimasa desempeña un papel importante en la generación de angiotensina II en respuesta a la lesión del tejido vascular. La quimasa de los mastocitos también induce la apoptosis de las células musculares lisas vasculares, en particular en la región de las lesiones ateroscleróticas. Además, durante la activación de los mastocitos se liberan varios mediadores secundarios, como interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6 e IL-8), factores de crecimiento (factor de necrosis tumoral α) y prostaglandina D (PGD₂). Estos mediadores no se almacenan en gránulos sino que son sintetizados por la célula y liberados de inmediato hacia la matriz extracelular.

Los mastocitos se distribuyen principalmente en el tejido conjuntivo de la piel, en la vecindad de los vasos sanguíneos pequeños, una diana para la histamina y los leucotrienos. También se encuentran en las cápsulas de los órganos y en el tejido conjuntivo que rodea los vasos sanguíneos de los órganos. Una excepción notable es el sistema nervioso central. Aunque las meninges contienen mastocitos, el tejido conjuntivo que rodea los vasos sanguíneos de pequeño calibre que hay dentro del encéfalo y la médula espinal carece de estas células. La falta de mastocitos protege al encéfalo y la médula de los efectos potencialmente destructivos del edema característico de las reacciones alérgicas. Los mastocitos también son abundantes en el timo y, en menor medida, en otros órganos linfáticos, pero no están presentes en el bazo.

En su membrana, las células cebadas maduras presentan inmunoglobulina E (IgE) que se encuentra unida a un receptor de membrana. Cuando las IgE presentan uniones entrecruzadas causan la liberación de mediadores bioactivos contenidos dentro de los gránulos citoplasmáticos, que incluyen histamina, heparina, proteasas, leucotrienos y citoquinas como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas (IL4, IL5 y IL6), induciendo un incremento de la permeabilidad vascular, vasodilatación, espasmo muscular, prurito, anticoagulación y activación de eosinófilos y neutrófilos; que en conjunto causan reacciones de hipersensibilidad localizadas y en casos severos reacciones de hipersensibilidad sistémica. Las características secretoras de las células cebadas varían de acuerdo a su localización, por ejemplo, las que se localizan en el tracto gastrointestinal secretan principalmente condroitin-sulfato por el contrario, las que se localizan en el pulmón secretan heparina predominantemente y las que se localizan en la piel histamina.

Los gránulos citoplasmáticos se tiñen metacromáticamente con Azul de Toluidina. La histamina es una amina básica que se forma por la descarboxilación del aminoácido histidina. La heparina es un mucopolisacárido ácido sulfatado y probablemente colabora con

la metacromasia de los gránulos. Las células primitivas, con la granulación esparcida, fina, contienen pequeña cantidad de heparina y se tiñen de azul (ortocromáticamente) con el azul de toluidina. Los mastocitos bien diferenciados con gránulos grandes, contienen una gran cantidad de heparina y se tiñen de rojo (metacromáticamente) (Norn, 1965).

BIOLOGÍA TUMORAL

Para comprender la biología celular del cáncer se debe ante todo conocer la biología celular normal y a partir de ésta seguir el desarrollo del tumor hacia atrás hasta las alteraciones que ocurrieron en la célula fundadora. Las células de los organismos multicelulares forman parte de una sociedad especializada que coopera para promover la supervivencia del organismo. En esta sociedad, la división celular, proliferación y diferenciación son estrictamente controladas y existe un equilibrio entre el nacimiento celular normal y la tasa de muerte celular normal (Moore *et al.*, 1998). La disociación de estos mecanismos normales homeostáticos puede conducir a la proliferación incontrolada o pérdida de la capacidad de morir, lo que lleva a una célula normal a que tome un fenotipo maligno.

Es bien sabido que la reproducción de los gametos ocurre por el proceso de la meiosis, mientras que la reproducción de las células somáticas implica dos fases conocidas como mitosis y citocinesis. La mitosis es una división nuclear y la citocinesis involucra la división del citoplasma, ocurriendo las dos en estrecha sucesión. La división nuclear está precedida por una duplicación del material genético de la célula durante un período conocido como interfase. Además de una copia de los cromosomas, este período se caracteriza por una marcada actividad celular en términos de ARN, proteínas y producción de lípidos. La alternancia entre mitosis e interfase en todos los tejidos es conocida como el ciclo celular.

El ciclo de replicación celular normal se divide en cinco fases. Comenzando con la finalización de la mitosis (M), las células pueden ingresar en una fase presintética (G1) de duración variable. Luego las células ingresan en la fase de síntesis del ADN (S). Una vez que las células dejan de sintetizar ADN, ingresan en la fase G2 previa a reiniciar la mitosis. G1 y G2 son las brechas entre dos mitosis y síntesis identificables a nivel morfológico. La duración de S, G2 y M es bastante constante, sin embargo, para G1 es muy variable. El término G0 fue otorgado para las células que no ciclan pero que pueden ser reclutadas e ingresar en el periodo G1.

Durante la interfase, la cromatina es muy larga y delgada; sin embargo, se acorta y se espesa a medida que avanza la interfase. La primera fase de la mitosis se conoce como profase y ve la primera aparición de los cromosomas. A medida que la fase progresa, los cromosomas aparecen como dos cromátides hermanas idénticas unidas en el centrómero. A medida que la membrana nuclear desaparece, las fibras del huso se forman e irradian desde los dos centriolos, cada uno ubicado en el lado opuesto de los polos de la célula. Las fibras del huso sirven para extraer los cromosomas a lados opuestos de la célula.

Durante la metafase, las fibras del huso traccionan de los centrómeros del cromosoma, que se alinean a la mitad del huso, a menudo denominado placa ecuatorial. Durante la anafase,

los centrómeros se dividen y las cromátides hermanas se separaron por la contracción de las fibras del huso. La etapa final de la división celular es la telofase, caracterizada por la formación de una membrana nuclear alrededor de cada grupo de cromosomas, seguido de citocinesis o separación del citoplasma para producir así dos diploides idénticos. Dicha progresión a través del ciclo celular dura aproximadamente 12 a 24 horas.

Las células son estimuladas para ingresar al ciclo celular en respuesta a factores externos que incluyen factores de crecimiento y adhesión celular. Durante la fase G1 del ciclo celular, las células responden a señales mitógenas. Una vez que el ciclo celular ha atravesado el punto de restricción (R) en la fase G1, las transiciones del ciclo celular se vuelven autónomas. La progresión a través del ciclo celular está mediada por la secuencia de activación e inactivación de una clase de proteínas llamadas ciclinas dependiente de quinasas (CDK) (Kong *et al.*, 2003). Las CDK consisten en un núcleo inactivo catalítico y están reguladas en tres niveles:

1. La actividad de CDK requiere la asociación con subunidades reguladoras conocidas como ciclinas. El nivel de CDK permanece constante a lo largo del ciclo celular; sin embargo, la concentración de ciclinas varía en una fase específica durante el ciclo celular. La síntesis periódica y la destrucción de ciclinas proporciona el nivel primario del control del ciclo celular.
2. La actividad de los complejos ciclina/CDK también está regulada por la fosforilación. La activación de complejos CDK/ciclina requiere fosforilación mediante quinasas activadoras de CDK; mientras tanto la fosforilación en residuos de treonina y serina suprime la actividad.
3. Las CDK también están estrechamente reguladas por una clase de proteínas inhibitoras conocidas como inhibidores de CDK (CDKI). Los CDKI pueden bloquear la progresión de G1/S uniendo complejos CDK/ciclina.

Cuando las células normales se encuentran expuestas a señales de estrés, radiación, daño de ADN, o agotamiento de oxígeno, la mayoría de las células tienen la capacidad para provocar la detención del ciclo celular en G1, S y G2 o ingresar a la muerte celular programada (apoptosis). Dentro de las células, una gran cantidad de sistemas de vigilancia llamados puntos de control, funcionan para reconocer y responder al daño en el ADN. Los puntos de control del ciclo celular ocurren en la fase G1 en respuesta al daño del ADN, durante la fase S para controlar la cantidad de replicaciones del material genético y la aparición de daño en ADN, y durante la fase G2/M para examinar el estado del huso. El punto de control inducido por daño al ADN es mediado por el supresor tumoral, la proteína p53, hasta el momento una de las más estudiadas. Dicha proteína juega un papel importante en el mantenimiento de la

inestabilidad genómica y forma parte de una vía de respuesta de estrés a varios factores exógenos y endógenos. La respuesta de p53 al estrés puede estar mediada por proteínas quinasas dependientes de ADN (ADN-PK) o por la ATM quinasa y conduce a la fosforilación del extremo N de p53. En las células normales, p53 posee una vida corta, empero, p53 fosforilada se estabiliza y puede funcionar como un regulador transcripcional que se une a gran cantidad de secuencias de genes, que incluye p21 (Lane, 1992). P21 tiene una alta afinidad por complejos G1 CDK/ciclina y actúa como inhibidor de CDKI actividad quinasa, deteniendo así las células en G1. Al mantener las células en G1, la replicación del ADN dañado se previene, y la propia maquinaria de reparación del ADN tiene la oportunidad de reparar daños antes de volver a ingresar al ciclo de crecimiento activo. Los niveles celulares de la proteína p53 están regulados por el producto de otro gen MDM2 (Wu *et al.*, 1993). El papel principal de MDM2 es actuar como un regulador negativo de la función de p53.

En las células tumorales se han descubierto genes en sus cromosomas, llamados oncogenes, que representan la fuerza impulsora en el crecimiento descontrolado de muchas células cancerosas. Presentes en la célula normal como proto-oncogenes, estos genes reguladores del crecimiento se activan de manera inapropiada y redundan en la conversión de la célula fundadora normal en otra cancerosa. Una vez activados, los genes actúan en forma continua dirigiendo las células hacia la división incontrolada, un comportamiento que se reconoce como cancer.

Actualmente, gracias a los descubrimientos brindados por la biología molecular, se ha dado a conocer el modo en que las señales del crecimiento anormal son transmitidas de célula a célula y desde la superficie celular hacia el núcleo. Pese a las enormes cantidades y diversidad de acciones, los genes, proteínas, factores de crecimiento y receptores de factor de crecimiento son clasificados de acuerdo con sus roles de función en las rutas que regulan o señalan el crecimiento. Cuando un factor de crecimiento se une a su receptor, éste se activa temporalmente causando a su vez la activación de otras proteínas en las moléculas estimulantes del crecimiento denominadas segundos mensajeros. Estas señales son finalmente transmitidas al núcleo, donde se induce la expresión de genes específicos que llevan a la división celular. Así, se genera una cascada de eventos que señalan al núcleo que se ha encontrado un factor de crecimiento y que debe comenzar la proliferación. El control preciso de estos eventos de señales, positivos y negativos, resulta necesario para mantener el crecimiento celular normal.

Se ha demostrado que los cánceres experimentales se deben a un cambio genético inicial, ya sea la activación de un oncogen dominante o la inactivación de un par de antioncogenes

recesivos. Sin embargo, en muchas neoplasias el mecanismo es desconocido porque no pueden demostrarse los mecanismos genéticos específicos.

Como se sabe, el cáncer es una enfermedad compleja multigénica, y se ha propuesto un modelo que intenta explicarla mediante forma secuencial; “iniciación, promoción y progresión” (Banchereau y Steinman, 1998). En este modelo, un evento genético dotaría a una célula somática con potencial replicativo ilimitado u otra ventaja de crecimiento o supervivencia de otras células en su medio ambiente (iniciación). Empero, dicho proceso no sería suficiente para dar aumento a un tumor, ya que la célula se mantendría limitada por factores del medio ambiente. Un segundo evento aumentaría aún más la capacidad de la célula para vencer a sus vecinas en este ambiente, lo que lleva a su expansión potencial en una masa tumoral reconocible (promoción). Finalmente, un tercer evento reforzaría el potencial maligno de la célula (invasión, destrucción de tejido y metástasis), lo que lleva a la enfermedad clínica progresiva. Se debe considerar que un “evento” no es equivalente a una sola mutación, sino que es más probable que represente una serie de mutaciones que actúan en conjunto para alterar el funcionamiento de la célula y el fenotipo morfológico. Aunque este modelo pueda parecer simplista y defectuoso, las evidencias experimentales demuestran que las mutaciones son aleatorias y no ocurren paso por paso.

Existen evidencias que aluden que en algunos casos las mutaciones están “dirigidas” debido a la presencia de un “fenotipo mutador”, en que los factores que controlan la replicación y reparación del ADN son propensos a más errores de los esperados por eventos aleatorios simples. Esto conduce a diferentes tasas de predisposición al cáncer, siendo mayor que la media en individuos con este “fenotipo mutador” y podría explicar por qué no todas las personas o animales expuestos a carcinógenos ambientales similares desarrollan las mismas formas de cáncer a la misma velocidad (Rothwell *et al.*, 1987).

En un exhaustivo documento realizado por Douglas Hanahan y Robert Weinberg se han sintetizado conocimientos de la biología tumoral en seis características esenciales para la transformación celular (Rosin *et al.*, 1986). Éstas características incluyen (1) autosuficiencia en señales de crecimiento, (2) insensibilidad a las señales anticrecimiento, (3) capacidad de evadir la apoptosis, (4) potencial replicativo ilimitado, (5) angiogénesis sostenida, y (6) capacidad de invadir tejidos y metastizar. Este documento describe una importancia menor sobre una lista de eventos, y realiza mayor énfasis en la síntesis de algunos conceptos importantes como: ningún gen es universalmente responsable de la transformación; cinco o seis mutaciones son el número mínimo probable requerido para dotar al fenotipo del cáncer; cada paso está regulado por múltiples vías bioquímicas interactivas, (Ricklin *et al.*, 2010), y por lo tanto mutaciones de diferentes genes a lo largo de una ruta pueden dar como resultado

fenotipos equivalentes y, por el contrario, las mutaciones del mismo gen pueden dar lugar a diferentes cánceres con biología distintiva; los tumores se comportan como tejido; y las interacciones entre el tumor y su microambiente son principales impulsores del comportamiento del cáncer. En 2011 Hanahan y Weinberg realizaron una actualización acerca de las características del cáncer, en la cual las características distintivas involucran la inestabilidad genómica, mutación e inflamación como fomentadores de tumores, e incluyendo además señas de identidad como desregulación de energía celular y evitando destrucción inmune.

La autosuficiencia de las señales de crecimiento merece una marcada importancia ya que podría afirmarse que uno de los eventos más importantes en la transformación neoplásica es la capacidad de las células para mantener la proliferación crónica. En condiciones normales las células se comunican entre sí e integran el ambiente detectando señales y gradientes. Puede mencionarse como ejemplo la migración, metabolismo y proliferación de células hematopoyéticas maduras que están reguladas de modo autocrino y paracrino por citosinas secretadas localmente. Las mismas citosinas pueden viajar sistémicamente y actuar de forma endocrina. Las citosinas trabajan por vinculación con receptores transmembrana, que inician a su vez la cascada de señalización que culmina en cambios transcripcionales que permiten que la célula adapte su comportamiento para que coincida con las señales del ambiente. Las actividades de estas citosinas, sus receptores y las correspondientes moléculas de señalización están firmemente sintonizadas. El sistema se puede cerrar cuando la concentración de la citosina cae por debajo de un umbral que pueda unir de forma estable el receptor, cuando el receptor deja de ser expresado, o cuando las moléculas de señalización están reguladas negativamente o inactivada de otra manera. Sin embargo, las mutaciones en incluso una de las moléculas involucradas en la regulación de estas vías puede proporcionar señales sostenidas de crecimiento en ausencia de la citosina iniciadora.

Los genes que codifican las proteínas promotoras del crecimiento normales (como ALK, Jak2, y STAT5) se llaman protooncogenes; las versiones mutadas que permiten que las células ganen autosuficiencia a partir de las señales ambientales se llaman oncogenes. Cabe señalar que no todos los genes promueven el crecimiento, algunos tienen la capacidad de convertirse en oncogenes y que los resultados de la activación son más comúnmente la senescencia o apoptosis, a menos que haya eventos adicionales que promuevan la transformación estable y la supervivencia.

Como bien se ha indicado una de las características esenciales es la insensibilidad a señales de anticrecimiento. Se sabe que además de la capacidad distintiva de inducir y sostener señales de estimulación de crecimiento de acción positiva, las células cancerosas también

deben eludir los mecanismos que regulan negativamente la proliferación celular; muchos de estos mecanismos dependen de las acciones de genes supresores del tumor. Para mantener la homeostasis, las células también deben integrarse en las señales de anticrecimiento del ambiente. La quiescencia en células no hematopoyéticas se aplica mediante señales entregadas por inhibición por contacto (Craig *et al.*, 2002). Las células hematopoyéticas, por otro lado, utilizan contacto célula-célula para mantener las interacciones dentro del nicho y regular el momento y la intensidad de la hematopoyesis, la inflamación y la inmunidad (Hayden *et al.*, 1993). Las señales de “alto” generalmente se entregan e integran por los productos de genes supresores de tumores, que debe su nombre gracias a la observación de que su inactivación facilita la formación de tumores. Los genes supresores de tumores equilibran la actividad de promoción del crecimiento proto-oncogenes y tienden a actuar en conjunto con estos en la mayoría de las vías bioquímicas. La pérdida de función de uno o más de los genes supresores de tumores ocurren en casi todos los cánceres, con inactivación de p53, RB1, PTEN o CDKN2A, cada uno visto en más del 50% de todos los tumores. Cada una de estas vías puede contribuir a la patogénesis de tumores en animales de compañía (Naranjo *et al.*, 2007).

La apoptosis, o muerte celular programada, es el resultado impreso en el genoma de cada célula en organismos multicelulares. La supervivencia requiere apoyo de factores extrínsecos (ambientales), así como un equilibrio preciso de la energía celular y el metabolismo. Las células derivadas de la médula ósea normalmente sufren apoptosis cuando las concentraciones de factores de supervivencia (por ejemplo; factor de células madres, IL-3, IL-7) o nutrientes son limitantes o cuando hay interrupciones severas en la bioenergética celular (Vernau *et al.*, 2001). La evasión de la apoptosis es una característica esencial adquirida de todo cancer, y puede ser el resultado de la pérdida de genes supresores tumorales proapoptóticos como p53 o PTEN o por ganancia de función de genes antiapoptóticos, como BCL2.

Un concepto más reciente en el campo de la muerte celular es la autofagia, un proceso que las células tumorales han cooptado eficientemente como un medio para sobrevivir bajo condiciones adversas (Snyder *et al.*, 2008). Como parte del programa de autofagia, las vesículas intracelulares denominadas autofagosomas envuelven orgánulos intracelulares y se fusionan con lisosomas. Allí, las organelas se descomponen y luego se canalizan para formar nuevas moléculas que soportan la maquinaria de producción de energía de la célula, lo que le permite sobrevivir en el ambiente estresado y limitado en nutrientes, lo que define la mayoría de los cánceres. Las células tumorales también deben evitar la muerte por anoikis o la pérdida integral de contacto célula-célula o célula-matriz (Craig *et al.*, 2002). El término

“anoikis” es reciente, haciendo referencia a la apoptosis inducida por la pérdida de anclaje de la célula a la matriz extracelular o porque las interacciones célula-matriz son insuficientes o inapropiadas (Meredith *et al.*, 1993, Frish y Francis, 1994). La ausencia de estas vías de muerte fisiológicas, genera que el cuerpo a menudo reaccione a las alteraciones anatómicas y fisiológicas causadas por la respuesta inflamatoria que tiene como blanco a las células cancerígenas. Esto es solo una vía que conduce a la necrosis, ya que parece que el proceso de la necrosis también podría estar regulado genéticamente, proporcionando otro mecanismo que favorece la supervivencia del conjunto (organismo o tumor) sobre la supervivencia de uno.

Otro de los factores importantes de la biología tumoral es el potencial replicativo ilimitado. La inmortalización es otra característica esencial del cáncer. El programa genético limita la cantidad de veces que una célula puede replicarse, llamado también límite de Hayflick, y cuando se alcanza este límite replicativo, la senescencia replicativa es inducida. Dicha senescencia no induce la muerte; las células mantienen la homeostasis energética y permanecen funcionales, pero experimentan cambios genéticos significativos caracterizados por la erosión de los telómeros. Las células que pueden replicar deben mantener la integridad de los telómeros, que son “tapones” hechos de repetición de secuencia de ADN, que protege a los cromosomas de la destrucción. Los tumores sólidos adquieren inmortalización predominantemente por activación del sistema enzimático de telomerasa y el consecuente mantenimiento de integridad de los telómeros. En células hematopoyéticas, la actividad de la telomerasa parece retenerse más tiempo que en otras células somáticas, por lo que es posible que esto facilite la inmortalización en el linfoma y la leucemia (Brown *et al.*, 1994.) El papel de la inmortalización y la importancia de la telomerasa (tanto para mantener la longitud de los telómeros y mantener otras funciones bioquímicas que son esenciales para la supervivencia celular) están bien establecidos; sin embargo, el papel de la senescencia replicativa ha sido cuestionado porque la tecnología mejorada ha permitido a los investigadores eludir este proceso en células normales (Zaba y Krueger, 2009).

Uno de los factores sumamente importante en la patogénesis tumoral es la angiogénesis sostenida. El proceso de la angiogénesis requiere de la acción coordinada de una variedad de factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular en células endoteliales y estromales. Hasta ahora, el factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF) y sus receptores comprenden la señalización mejor caracterizada en la vía de angiogénesis tumoral (*figura 6*)

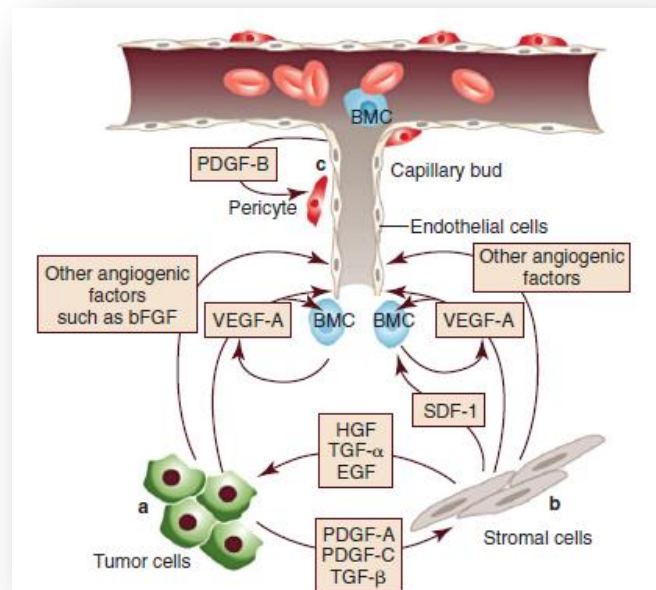


Figura 6: Esquema ilustrativo de algunos de los jugadores moleculares y celulares en el microambiente tumoral. A) las células tumorales producen VEGF-A y otros factores angiogénicos, como bFGF, angiopoyetinas, IL-8, factor de crecimiento placentario (PlGF) y VEGF-C. Estas estimulan las células endoteliales residentes para proliferar y migrar. B) Una fuente adicional de factores angiogénicos es el estroma, que es un compartimento heterogéneo, comprende componentes fibroblásticos, inflamatorio y células inmunes. C) Las células endoteliales producen PDGF- β , lo que promueve el reclutamiento de pericitos en la microvasculatura, luego de la activación del receptor β de PDGF (PDGFR- β).

VEGF-A, factor de crecimiento endotelial vascular A; SDF-1, factor 1 derivado de células estromales; HGF, factor de crecimiento de hepatocitos; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas;

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico. (Ferrara y Kerbel, 2005)

(Newlands *et al.*, 1994). VEGF se une a varios receptores tirosina quinasa, incluido el receptor VEGF-1 y VEGFR-2. Este último es el principal mediador de efectos angiogénicos de VEGF. Sin embargo, VEGFR-1 se expresa por algunas células tumorales y pueden mediar señales quimiotácticas, tener por lo tanto un papel potencialmente importante en el crecimiento del cáncer. La expresión de VEGF es regulada por hipoxia e inflamación. El factor de transcripción factor-1 α (HIF) inducible por hipoxia, es un importante regulador de la expresión de VEGF. Otras moléculas de señalización también contribuyen a la angiogénesis, incluido el factor de crecimiento derivado de plaquetas- β (PDGF- β) y su receptor (PDGFR) y las angiopoyetinas. Se requiere PDGF- β para el reclutamiento de pericitos y maduración de nuevos capilares.

Hace más de 30 años se propuso un rol importante de la angiogénesis en el cáncer por Folkman, idea que demoró en ser aceptada (Cruz-Arambulo *et al.*, 2004). Esta predicción

proponía el impacto de la angiogénesis en los tumores sólidos, pero tenía poca relevancia para los tumores de la sangre y linfa (linfoma, leucemia, mieloma múltiple). Los primeros indicios que demostraban que dicha noción era equívoca procedían de beneficios en situaciones inesperadas en pacientes con leucemia linfocítica crónica con tratamientos con compuestos antiangiogénicos (Weiss, 2002), y posteriores éxitos en algunos pacientes con mieloma múltiple (Skorupski *et al.*, 2009). Un estudio demuestra que la densidad de microvasos se correlaciona de manera similar con el comportamiento agresivo del linfoma canino (Uno *et al.*, 1993) y hallazgos similares han sido reportados para otros tumores sólidos y derivados de la sangre en perros, como en el cáncer de células cebadas y el cáncer de mama (Hafeman *et al.*, 2010). Se ha sugerido que las terapias antiangiogénicas benefician a los pacientes con cáncer al promover la normalización del vaso, revertir la disfunción anatómica y hemodinámica creada por el microambiente tumoral, deshabilitando algunas de las ventajas intrínsecas que esto proporciona para las células cancerosas, y permitiendo además mejor penetración de drogas. La normalización vascular depende de la restauración del equilibrio entre todos los constituyentes que forman vasos sanguíneos desde la médula ósea y el estroma, incluidos los pericitos, células derivadas de mieloides y progenitores endoteliales, todas las cuales contribuyen y responden al “interruptor angiogénico”, mediante el cual previamente los tejidos quiescentes desencadenan la formación de nuevos vasos sanguíneos asociados con el crecimiento tumoral.

Dos mecanismos biológicos que determinan malignidad del cáncer son la infiltración y la metástasis, para esto, el microambiente tumoral juega un rol decisivo al crear y establecer las características de crecimiento, morfología e invasividad de un tumor maligno. El microambiente está formado por un tejido complejo que contiene la matriz extracelular, las células tumorales y no tumorales, una red de señales por citosinas, quimosinas, factores de crecimiento, proteasas, que controlan, como bien se citó anteriormente, la comunicación autocrina y paracrina entre las células individuales, haciendo posible la progresión tumoral. Durante el desarrollo del tumor primario, el estroma tumoral y los continuos cambios genéticos en sus células hacen factible que ellas migren, debiendo contar previamente con un nicho premetastásico receptor que permita su supervivencia y su crecimiento a distancia. Estos nichos son inducidos por factores producidos por el tumor primario, que si es erradicado, los nichos activos pasan a ser los responsables de la activación de las células diseminadas que están en estado de latencia. Se ha planteado que el nicho metastásico puede ser un blanco ideal para nuevas terapias que hagan posible el control de las metástasis (Arvelo *et al.*, 2013).

El cancer es, entonces, el resultado fenotípico de una gran serie de cambios que se produjeron en un largo período de tiempo para desarrollarse. La aplicación de un agente cancerígeno (carcinógeno) a tejidos no conduce a la producción inmediata de una célula cancerosa. Después del paso de iniciación producido por el agente, sigue un período de promoción del tumor. Dicha promoción puede ser causada por el mismo agente iniciador o por otras sustancias, como el crecimiento normal de promotores u hormonas. El paso inicial es un paso rápido y afecta el material genético de la célula. Si la célula no repara este daño, puede progresar hacia un fenotipo maligno. A diferencia de la iniciación, la progresión puede ser un proceso muy lento y puede incluso no manifestarse en la vida del animal

Como se ha mencionado anteriormente, los proto-oncogenes son genes claves para el control del crecimiento y proliferación celular, siendo sus roles muy complejos. Se pueden dividir, sus sitios y modos de acción en la célula normal del siguiente modo:

- ✓ **Factores de crecimiento:** son moléculas que actúan sobre la célula a través de los receptores de superficie celular. Su contribución a la carcinogénesis puede ser a través de la producción excesiva de factores de crecimiento o cuando un factor de crecimiento se expresa en una célula y que normalmente no funciona en esta célula.
- ✓ **Receptores del factor de crecimiento:** varias proteínas derivadas de proto-oncogenes forman parte de los receptores de superficie celular para factores de crecimiento. La unión del ligando al receptor es la etapa inicial de la entrega de señales mitogénicas a las células. Su función en la carcinogénesis puede ser a través de alteraciones estructurales en estas proteínas.
- ✓ **Proteína quinasas:** están asociadas con la superficie interna de la membrana plasmática y están involucradas en la transducción de señales en la unión ligando-receptor.
- ✓ **Transductores de señal:** la unión de un factor de crecimiento extracelular al receptor de membrana conduce a una serie de eventos por los cuales la señal mitogénica es transducida al núcleo de la célula. Es esencial para esta señalización la fosforilación sucesiva de los segundos mensajeros como guanosina trifosfato (GTP) y proteínas que se unen a GTP (proteínas G). Durante la transducción de señal, la GTP se convierte en guanosina difosfato (GDP) por la actividad de la guanosina trifosfatasa (GTPasa) de las proteínas G. Un grupo de proto-oncogenes llamados Ras codifican proteínas con actividad GTPasa, y en la célula normal, ayuda a modular la proliferación celular. Las mutaciones en el proto-oncogen Ras pueden contribuir a la proliferación descontrolada.

- ✓ **Proteínas nucleares y factores de transcripción:** estos codifican proteínas que controlan la expresión génica. Estos proto-oncogenes tienen un papel importante en la proliferación celular.

METÁSTASIS

La metástasis se define como la diseminación de células neoplásicas a sitios distantes, donde proliferan para formar una masa macroscópica. Es implícita en este proceso la existencia de un tumor primario. El proceso de metástasis se cree que ocurre a través de la finalización de una serie de eventos escalonados (*figura 7*). Para que este proceso pueda ocurrir, una célula cancerosa debe abandonar el sitio del tumor primario, pasar a través de la membrana basal del tumor, y luego a través o entre las células endoteliales entrar en la circulación (intravasación). Mientras se encuentran en circulación las células tumorales deben ser capaces de resistir la anoikis (muerte celular programada asociada con la pérdida de contacto celular), evadir la respuesta inmune y el estrés físico, y el eventual arresto en órganos distantes.

Para llegar a dicho sitio distante, la célula deberá abandonar la circulación y sobrevivir en el microambiente hostil del tejido extraño. Se cree que estos sitios secundarios están preparados para recibir células metastásicas a través de efectos dirigidos y mediados por el tumor primario mismo (nicho premetastásico). Este sitio distante puede ser el órgano objetivo eventual para metástasis o puede ser un sitio temporal. En cualquier caso, la célula neoplásica permanecerá inactiva durante un período variable de tiempo y, a menudo, prolongado antes de mudarse a su ubicación final. Luego de un tiempo en latencia, las células reciben señales para proliferar, crear nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis) o cooptar vasos sanguíneos existentes, y luego crecer con éxito en una lesión metastásica medible (Mendoza y Khanna, 2009). La célula cancerosa metastásica debe tener el conjunto apropiado de cambios genéticos disponibles para completar todos los pasos de la cascada metastásica. Cientos de genes y sus proteínas resultantes contribuyen al desarrollo del cáncer y su habitual habilidad de realizar metástasis. Los cánceres metastásicos pueden lograr dicho fenotipo a través de constelaciones de distintos cambios genéticos y eventos epigenéticos, que completan una respectiva suma de procesos necesarios para alcanzar la metástasis. Dos clases de genes se han definido ampliamente como contribuyentes al fenotipo metastásico, incluyendo genes estimulantes de metástasis y genes supresores (Steeg, 2004). Dichos genes tienen funciones en el desarrollo normal y fisiológico (es decir, en la migración celular, invasión tisular y angiogénesis) y que son subvertidas por la célula cancerosa en la adquisición del fenotipo metastásico. Se debe aclarar que muchos genes asociados a metástasis tienen funciones que también ayudan a la formación y progresión de tumores. Varios de estos genes asociados a metástasis han sido encontrados en neoplasias en caninos y felinos (Paoloni *et al.*, 2009). La pérdida de los genes supresores no se cree que

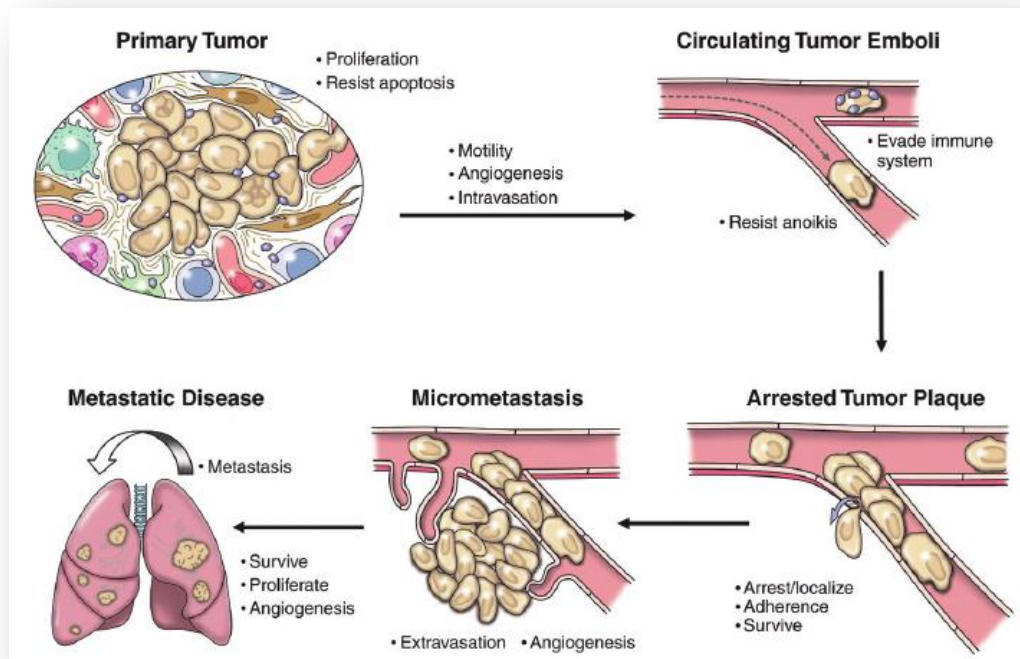


Figura 7: El esquema intenta representar la cascada metastásica, donde se describe un conjunto de pasos discretos por los que las células deben moverse como parte del proceso de metástasis. Esto comienza con el desarrollo del tumor primario en el cual las células deben proliferar, resistir la apoptosis y desarrollar interacciones con muchas células huésped del microentorno. Luego debe permitir que células metastásicas entren y sobrevivan en la circulación sanguínea. Las células posteriormente se detienen en lugares distantes, extravasaron y sobreviven en el microambiente de lugares distantes. La detención de las células puede ser en el órgano secundario final donde la metástasis se vuelve clínicamente evidente o las células inicialmente pueden estar en un “sitio santuario” donde pueden permanecer inactivas antes de pasar al sitio secundario final. La supervivencia de las células en dichos sitios distantes es un obstáculo que deben superar. De hecho, la mayoría de las células que llegan a lugares distantes no sobreviven. En el sitio secundario, las células tumorales pueden proliferar y progresar después del desarrollo del fenotipo angiogénico. (Withrow y MacEwen’s, 2013)

estén asociados con la formación de tumores; sin embargo, se cree que su pérdida contribuye en diferentes pasos de la cascada metastásica (Shoushtari *et al.*, 2011).

Luego del crecimiento del tumor primario, la intravasación de una célula neoplásica en la circulación vascular o linfática es el primer paso requerido en la cascada de la metástasis. Este proceso de intravasación requiere que una célula tumoral sea móvil y capaz de digerir, modular o escapar de la matriz extracelular (Liotta y Kohn, 2001). Los mecanismos específicos utilizados por las células tumorales para invadir e intravasarse incluyen el

modelo clásico de degradación enzimática de las células de la matriz extracelular conocida como invasión mesenquimal. A diferencia, las células tumorales también pueden desarrollar la llamada invasión ameboide, en la que se deslizan individualmente entre las fibras de la matriz extracelular sin evidencia o necesidad de degradación enzimática (Sabeih *et al.*, 2009). Finalmente, un método distinto denominado invasión colectiva se refiere a la extensión de la masa regional de un tumor en los tejidos circundantes (Scott *et al.*, 2011).

En la forma clásica de invasión del mesénquima, las proteasas y metaloproteasas (MMP) se consideran necesarias para el fenotipo invasivo. La expresión de los miembros de esta familia de enzimas se han encontrado en la mayoría de tumores malignos, en humanos, caninos y felinos (Jankowski *et al.*, 2002). La actividad de las MMP en el osteosarcoma y cánceres de mastocitos se han correlacionado con el grado y propensión metastásica (Leibman *et al.*, 2000). La evidencia reciente también sugiere que la expresión de enzimas que degradan la matriz y otros factores de crecimiento pueden no ser necesarios en las propias células tumorales, pero se puede proporcionar por células inflamatorias (es decir, macrófagos) reclutados por el crecimiento del tumor (Qian y Pollard, 2010).

Entonces, como bien se ha expuesto, la supervivencia de las células malignas en el órgano receptor para formar micrometástasis no está asegurada, ya que pueden existir diferencias entre el microambiente del tumor primario y el lugar donde se establecerán las células cancerosas (Arvelo, 2013). Es debido a esto que se ha propuesto el modelo de nicho premetastásico, el cual se puede describir como el lugar con las condiciones microambientales necesarias para la supervivencia de las células tumorales diseminadas (Psaila y Lyden, 2009). Para su adaptación, despliegan mecanismos para modificar el nuevo microambiente. Es por esto que establecen, junto con las células del estroma, una red de señalización para promover su crecimiento, satisfacer las demandas metabólicas para sintetizar proteínas proangiogénicas y formar así nuevas redes vasculares y facilitar la supervivencia inicial en la nueva localización (Folkman, 1971), se han documentado varios estudios en los que se ha demostrado que el incremento de la capacidad de metástasis no es el resultado de mecanismos de adaptación de las células tumorales que les permitan el crecimiento en un órgano específico, sino más bien la selección gradual de un clon con mutaciones diferentes de las observadas en el tumor primario. La inestabilidad genómica y la heterogeneidad de las células cancerosas, se evidencia en las pérdidas, ganancias y reordenamiento cromosómico de los tumores (Ruddon, 1995).

NICHO METASTÁSICO

El nicho metastásico juega un rol importante dentro de los factores primordiales que determinan el éxito o fracaso de la metástasis. Para que esto ocurra deben suceder una serie de eventos donde se destacan: la modificación de la matriz extracelular; la remodelación de la red vascular; la participación de células de la médula ósea; la hipoxia y la expresión de una gran variedad de moléculas de señalización. Además, se suma la participación de células no transformadas, como lo son los fibroblastos y las células endoteliales, más la deposición de moléculas tales como la fibronectina, tenascina-c y la periostina (Oskarsson *et al.*, 2011). En cuanto a tejidos receptores particulares, la fibulina-5 reduce sus niveles para que la metaloproteasa MMP-9 remodele la matriz en la metástasis del hígado y pulmón, contribuyendo de esta manera a la formación del nicho premetastásico (Moller *et al.*, 2011). La enzima lisil-oxidasa, LOX, participa activamente en la remodelación de la matriz y en la formación del nicho, ya que esta enzima tiene la capacidad de enlazarse al colágeno y la elastina. La expresión de la enzima LOX es incrementada en las células tumorales expuestas a condiciones de hipoxia (Wong *et al.*, 2011). Kaplan y col, demostraron que las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea, que expresan el receptor-1 del factor vascular de crecimiento endotelial VEGFR-1, forman agregados celulares en los nichos premetastásicos. También han estudiado la adhesión y formación de agregados celulares después de la implantación de las células tumorales, observando un incremento en la expresión de la fibronectina y un aumento en la proliferación de los fibroblastos residentes en respuesta al tumor primario (Kaplan *et al.*, 2005).

Existen varios tipos de células que forman parte de los componentes del nicho metastásico, destacando poblaciones heterogéneas de células inmunes, células endoteliales, fibroblastos, macrófagos, pericitos y células progenitoras de la médula ósea, destacándose:

Células inmunes: representadas por aquellas células que participan activamente en los procesos de inmunidad; lo que incluye macrófagos, neutrófilos, mastocitos, células supresoras de origen mieloide, células dendríticas, células natural killer, más células de la inmunidad adaptativa como lo son linfocitos T y B. Las células inmunes que infiltran el tumor, excluyendo las células NK, producen citosinas promotoras de tumores tales como el factor de necrosis tumoral α y los tipos interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, que incrementan la señalización en las células premalignas. Esta señalización no sólo estimula la progresión tumoral, sino que induce la producción de citosinas por parte de las propias células tumorales (Grivennikov *et al.*, 2010).

Neutrófilos: primeras células que acuden al sitio de infección. Su degranulación libera enzimas líticas, así como también especies reactivas ROS, O₂, H₂O₂, HOCL con potencial antimicrobiano (Borregaard y Cowland, 1997).

Además producen citosinas como TNF α , IL-1 β , IL-1R α , IL-12 y VEGF; las quimiosinas CXCL1, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CCN3, y CCL4, involucradas en la angiogénesis (Scapini *et al.*, 2000). La quimiosina CXCL8 es producida abundantemente por las células tumorales, que liberadas al microambiente, representan un potente quimioatrayente de neutrófilos al interior del tumor. Además, CXCL8 y otras quimiosinas se han asociado con la angiogénesis por activación directa de CXCR2 extracelular (Strieter *et al.*, 2005). La citosina TNF α , liberada en el microambiente tumoral, está relacionada con la progresión tumoral induciendo la degranulación de los neutrófilos, liberando VEGF y favoreciendo la angiogénesis por la producción de CXCL8, CXCL1 (Balkwill, 2006).

Células Dendríticas: constituyen una población heterogénea integrada por dos tipos de células: la mioide CD11c+ y CD123lo y las células plasmocitoides CD11c y CD123hi (Liu y Nussenzweig, 2010). Se ha demostrado que en diversos tipos de tumores, ellas presentan alteraciones específicas en su capacidad estimulante con el consecuente desarrollo anómalo de la diferenciación de las células mieloides (Gabrilovich, 2004).

Uno de los mecanismos por medio del cual hay una diferenciación anormal de las células mieloides, es la activación constitutiva de los traductores de señal del activador de transcripción-3, STAT3 que promueve la proliferación continua y la acumulación de células mieloides inmaduras, contribuyendo a la supresión de la respuesta inmune ante el tumor asociada a la angiogénesis (Yu *et al.*, 2009). Dos moléculas pro-inflamatorias liberadas por las células dendríticas, como son TNF α y la osteopontina, están asociadas a la angiogénesis (Braumuller *et al.*, 2013). Las células dendríticas pueden secretar quimiosinas proangiogénicas tales como CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL8 y CCL2. Por el contrario, células dendríticas maduras pueden inhibir la angiogénesis por la liberación de la citosina IL-12 y las quimiosinas CXCL9, CXCL10 y CCL21 (Albini *et al.*, 2009).

Células Supresoras de Origen Mioide: (MDSCs), representan un papel activo en la promoción de tumores y en la evasión de la respuesta inmune. Cuando son células inmaduras parecen tener características de monocitos/macrófagos y granulocitos (Peranzoni *et al.*, 2010). Altos niveles de factores pro-inflamatorios en el ambiente microtumoral, tales como GM-CSF, IL-1b, IL-6, y S-100, inducen el reclutamiento y expansión de las células supresoras de origen mioide, aumentando la actividad pro-tumoral (Bunt *et al.*, 2006). Por otra parte, las MDSCs participan en la promoción de la angiogénesis del tumor, a través de la liberación de factores solubles tales como MMP9 y VEGF. Datos experimentales sugieren

que estas células son también capaces de diferenciarse en células endoteliales (Murdoch *et al.*, 2008).

Células Asesinas Naturales: Estas células, conocidas como NK, son efectoras de linfocitos de la inmunidad innata que potencialmente pueden controlar los tumores por su actividad citotóxica. Como otros tipos celulares, las células NK pueden infiltrarse dentro de la masa tumoral, donde su microambiente es capaz de afectar la funcionalidad de estas células por una amplia gama de citosinas y factores solubles, ya sea inhibiendo la función citotóxica o promoviendo el fenotipo angiogénico.

Células T: La inhibición del flujo de linfocitos T durante la angiogénesis y la remodelación del estroma representa una característica del microambiente tumoral, dando lugar a alteraciones de su funcionalidad. Ello es debido a la activación y expansión de las células mieloides y los factores solubles secretados por el tumor y las células inflamatorias. El típico ambiente tumoral inmunosupresivo es caracterizado por una fuerte inducción de CD4+ CD25+ FOXP3 Treg y activación de Th2, Th17 (Motz y Coukos, 2011).

Células B: La estimulación de las células B culmina en la producción de las inmunoglobulinas (Ig) que participan en la inmunidad humoral. Ellas segregan una variedad de citosinas como las interleucinas IL-6, IL-10, el factor de necrosis tumoral TNF- α , el factor estimulante de colonias de monocitos y granulocitos GM-CSF y la linfoxina LT, que participan en la inmunidad humoral (Pillai *et al.*, 2011).

Proteínas del complemento se asocian con las inmunoglobulinas y forman complejos circulantes inmunológicos (CIC), cuya deposición en el parénquima es debida a los defectos en la red vascular, bien sea por el tumor o por una angiogénesis patológica, lo cual inicia una cascada de reacciones (Gunderson y Coussens, 2013). En algunos tipos de cáncer se ha encontrado que los niveles de complejo CIC en el parénquima tumoral se correlacionan con un aumento de la carga tumoral, por tanto indica un mal pronóstico (Lu *et al.*, 2008).

Mastocitos: Representan un subtipo peculiar de granulocitos que desempeñan un papel central en el proceso inflamatorio. También se ha encontrado que participan en la vascularización de tumores malignos hematológicos, donde pueden integrarse en la pared del vaso por un proceso de mimetismo vascular (Nico *et al.*, 2008). La participación de los mastocitos en el proceso de la angiogénesis está asociada con la producción de diversas citosinas y quimosinas (Marichal *et al.*, 2013). Por otra parte, las proteasas producidas por los mastocitos promueven la angiogénesis (de Souza *et al.*, 2012). La b-triptasa es una proteasa neutra que representa un abundante mediador que se encuentra almacenada en los gránulos de los mastocitos y juega un papel importante en la inflamación, ya que activa la

liberación de la proteasa por los receptores tipo 2 que están directamente involucrados en la vascularización (Ammendola *et al.*, 2014).

Macrófagos Asociados al Tumor (TAM): se comportan como reguladores de la tumorigénesis, bien sea como residentes o como derivados de la médula ósea o bazo. Los macrófagos son considerados clásicamente como células efectoras durante la defensa inmune, sin embargo numerosos estudios han demostrado su papel en la progresión tumoral (Qian y Pollard, 2010). Estos macrófagos son una fuente importante de proteasas, como la cisteína y la catepsina, que participan en la progresión tumoral (Shree *et al.*, 2011). Los TAM presentan funciones antagónicas entre la homeostasis del tejido normal y la tumorigénesis, razón por la cual los macrófagos son funcionalmente plásticos y pueden alterar su fenotipo para adaptarse a diferentes condiciones fisiológicas (Mosser y Edwards, 2008). Los TAM pueden presentar un fenotipo “M1” que producen la citosina pro-inflamatoria tipo I que participa en la presentación de antígenos, jugando un papel antitumorogénico, más un fenotipo “M2” que producen citosina tipo II que promueven la respuesta anti-inflamatoria y la función protumorogénica (Biswas y Mantovani, 2010). Se ha sugerido que en algunas condiciones ambientales, como en la hipoxia tumoral, en una transición de “M1” a “M2”, los TAM se acumulan en las regiones de hipoxia del tumor, además de la endotelina-2 y VEGF. Hay que destacar que la acumulación de TAM, se correlaciona con la angiogénesis y la posterior adquisición del fenotipo invasivo (Escribese *et al.*, 2012).

Fibroblastos Asociados al Cáncer (CAFs): son las células predominantes del tejido conectivo responsables de la elaboración de los componentes de la matriz extracelular y la membrana basal, estando asociados a la diferenciación de las células epiteliales, siendo mediadores de la respuesta inmune (Kalluri y Zeisberg, 2006). Estos fibroblastos son altamente numerosos en el microambiente tumoral, siendo muy distintos de los fibroblastos normales. En cáncer de mama, los fibroblastos asociados al cáncer estimulan la metástasis de células malignas, mientras que los fibroblastos normales suprimen la metástasis (Dumont *et al.*, 2013). Esto evidencia que los fibroblastos asociados al cáncer constituyen una célula algo diferente de su contraparte normal. Por otra parte, no está claro el origen de los fibroblastos asociados al cáncer durante la progresión de la enfermedad (Marsh *et al.*, 2013), algunos estudios sugieren que se generan a partir de la transición endotelio-mesénquimal (EMT) de las células endoteliales de los vasos sanguíneos asociados a los tumores (Potenta *et al.*, 2008). Los fibroblastos asociados al cáncer interactúan con las células tumorales y otros componentes del estroma a través de la producción y secreción de diversos factores de crecimiento, citosinas y quimiosinas. Estos fibroblastos, activados por la infiltración de

células inmunes, producen quimiosinas proinflamatorias como CXCL1 y CXCL2 mediante el reclutamiento de TAM en los tumores primarios (Erez *et al.*, 2010), mientras que la quimiosina CCL5 secretada por fibroblastos asociados al cáncer reclutan las células T-reg (siglas de *tumor-infiltrating regulatory T cells*) por señalización a través del receptor CCR1 expresado en estas células (Tan *et al.*, 2011). Por otra parte, la quimosina CXCL12 y el factor de crecimiento de fibroblastos 2, FGF-2, liberado por CAF, estimula la neoangiogénesis por reclutamiento de células progenitoras endoteliales y células endoteliales vasculares (Orimo *et al.*, 2005). En la transición epitelio-mesénquima, TEM, los fibroblastos asociados a tumores son activados por TGF- β , PDGF, FGF y proteasas. Una vez activados los fibroblastos asociados al cáncer, estos secretan factores de crecimiento, incluyendo VEGF que induce permeabilidad vascular y la angiogénesis.

Pericitos: son células mesenquimales especializadas que están relacionadas con el músculo liso, actúan como soporte de las células endoteliales y contribuyen tanto a la homeostasis como a la estabilización, maduración y remodelación de los capilares (Dore-Duffy y Cleary, 2011). La íntima relación anatómica entre células endoteliales y los pericitos sugiere una estrecha interacción mediante los contactos celulares a través de la señalización paracrina. El factor PDGFB, siglas de *Platelet-derived growth factor B*, es un miembro de la familia PDGF secretado por las células endoteliales que se une al receptor tirosín-quinasa PDGFR expresado en la superficie de los pericitos. Cuando el ligando PDGFB se une a PDGFR hay una dimerización y origina una cascada de señalización intracelular que promueve la proliferación y migración celular (Heldin y Westermark, 1999). La angiopoyetina-1, Ang-1, es un ligando soluble producido por los pericitos que se une al receptor tirosín-quinasa Tie-2 expresado por las células endoteliales (Sundberg *et al.*, 2002). La interacción entre Ang-1 y Tie-2 es fundamental para la maduración y estabilización del endotelio (Falcón *et al.*, 2009). El TGF β , siglas de *transforming growth factor β* , es un factor de crecimiento expresado por las células endoteliales y los pericitos durante el proceso de la angiogénesis (Goumans *et al.*, 2002). Se encuentran presentes en la mayoría de los tumores, aunque su asociación con el endotelio sea anómala (Raza *et al.*, 2010). Diferentes estudios han demostrado que son imprescindibles para el mantenimiento de la red vascular tumoral, al igual que sucede con los vasos normales, ya que el VEGF producido por el pericito es necesario para la supervivencia de las células endoteliales en ambos contextos (Darland *et al.*, 2003). Una hipótesis considera que la reducción del número de pericitos en los vasos tumorales podría aumentar la intravasación de células tumorales, promoviendo su diseminación hematogena. En el establecimiento de un tumor se puede generar un ambiente inflamatorio, habiéndose observado que en muchos de ellos se crea un ambiente pro-inflamatorio compuesto de

citosinas, quimiosinas, factores de crecimiento, estroma activado, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular y agentes que inducen daño en el ADN. El microambiente inflamatorio inducido por las células tumorales afecta la función inmuno efectora a través de células inmunosupresoras del tipo macrófagos asociados al tumor (TAM), células mieloides inmaduras Gr1+ y Mac1+, linfocitos T reguladores (Treg), CD4+, CD25+, natural killer T (NKT), etc. Es posible que suceda a través de la reducción del número de células dendríticas para iniciar y mantener una respuesta inmune antitumoral (Nelson y Ganss, 2006). Las proteínas de fase aguda C reactiva (CRP), más la amiloide A (SSA), desempeñan un papel muy importante en la inducción de este medio inflamatorio. Las proteínas SAA son también quimiotácticas para otras células inflamatorias tales como los mastocitos y linfocitos T, así como en la inducción de la expresión de enzimas para la remodelación de la matriz extracelular y en la producción de citosinas inflamatorias como TNF α que promueven el crecimiento tumoral. Las células mieloides supresoras CD11b+ Gr1+, inhiben a las células T y NK protegiendo a las células tumorales de la destrucción inmunológica (Yan *et al.*, 2010). Las células T reguladoras (T reg) se encuentran en el microambiente tumoral y presentan diferente actividad inmuno-moduladora en el cáncer. En condiciones fisiológicas normales las células T reg regulan la expansión y activación de los linfocitos T y B, desempeñando un papel crítico en la homeostasis citotóxica de los linfocitos (Gasteiger *et al.*, 2013). En base a la respuesta a diferentes estímulos ambientales, las células T reg tienen diferentes efectos en la tumorigénesis, siendo un ejemplo los tumores de mama, en los cuales se observa que un incremento de las células T reg se correlacionan con una menor supervivencia, en tanto que en el cáncer colorrectal las T reg están asociado a una mejor supervivencia. Similar a las células mieloides supresoras o MDSCs, las células T reg suprimen la presentación del antígeno asociado al tumor, así como también interfieren con la función de las células T citotóxicas mediante la inhibición por la liberación de gránulos citolíticos.

El proceso mediante el cual las células cambian de un fenotipo epitelial a un fenotipo mesenquimal es conocido como transición epitelio-mesénquima (EMT). Dicho proceso se puede definir como un programa celular que permite la transición fenotípica de célula epitelial a mesenquimal. La zona marginal de un tumor es un lugar activo e interactivo de suma importancia en el microambiente tumoral, donde se acumulan células inmunes y células estromales. En el caso de las células mieloides inmaduras que se acumulan en esta región, ellas impiden la diferenciación de las células presentadoras de antígenos, favoreciendo de esta manera la evasión por parte de las células tumorales. Los macrófagos son otro tipo de células principales que se encuentran en la zona marginal, los cuales son reclutados por productos secretados por las células tumorales (Condeelis y Pollard, 2006).

Los estudios han demostrado mediante la presencia o ausencia de TGF- β , la importancia del estroma durante la transición epitelio-mesénquima en el cáncer. También la transición epitelial-mesénquima puede ser inducida por TGF- β secretado por las plaquetas. Los macrófagos también promueven la invasión de las células tumorales a través del suministro de factores migratorios, tal como el EGF, que mediante la regulación en la producción de colágeno fibrilar, acelera la motilidad celular e induce la actividad proteolítica para la remodelación de la matriz extracelular. Durante la transición de EMT se producen alteraciones en la adhesión célula-célula, interacción célula-sustrato, degradación de la matriz extracelular y en la reorganización del citoesqueleto. La EMT se alcanza completamente cuando tiene lugar la degradación de la membrana basal y una célula mesenquimática pueda migrar, adquiriendo así la capacidad invasiva, lo que permite la diseminación metastásica. Por otra parte, las metástasis y los tumores primarios son histológicamente similares, lo cual puede interpretarse como una EMT reversible que permitiría, en primera instancia, la migración y diseminación hacia diferentes órganos. Una vez ubicadas las células que han presentado la EMT, activarían el programa opuesto, la transición de MET, lo cual permitiría establecer colonias secundarias retomando la morfología epitelial y adquiriendo de nuevo la habilidad de crecer y proliferar.

Como bien se mencionó anteriormente, el factor vascular de crecimiento endotelial (VEGF), es una molécula pro-angiogénica y ha sido implicada en varios pasos del proceso angiogénico (Fukuda *et al.*, 2003; Siemeister *et al.*, 1998). VEGF es un mitógeno específico para el endotelio, que es predictivo de la progresión y recurrencia tumoral. Se sabe que en tumor de células cebadas tanto en ratones como humanos, las células son capaces de producir y secretar VEGF (Gerber y Ferrara, 2003). La neoplasia canina de células cebadas, también es capaz de expresar VEGF y receptores VEGF, aunque VEGF parece no ser un regulador autocrino del crecimiento en mastocitoma canino (Rebuzzi *et al.*, 2007). Debido a la importancia de la angiogénesis en el desarrollo tumoral, han surgido nuevas estrategias terapéuticas angiogénicas para el tratamiento del cáncer (Thamm y Vail, 2007; Siemeister, 1998). Un anticuerpo recombinante monoclonal humanizado contra VEGF ha sido aprobado para el tratamiento en tumores humanos (Ranieri *et al.*, 2006). Así, el estudio de la expresión de VEGF en mastocitoma canino podría esperarse de manera similar para proporcionar nuevas perspectivas para el tratamiento de esta enfermedad.

La prostaglandina E2 (PGE-2), un producto final importante de la reacción catalizada por la ciclooxigenasa-2, se ha informado que también estimula la angiogénesis. La PGE-2 parece inducir a las mastocitos humanos a producir VEGF sin necesidad de degranulación (Abdel-Majid y Marshal, 2004). Además, la PGE-2 tiene un efecto dependiente de la dosis en la

inducción de mastocitos primarios para liberar el proangiogénico quimioquina quimioatrayente de monocitos proteína-1 (MCP-1) (Nakayama *et al.*, 2005). Aunque el rol de las células cebadas en procesos inflamatorios y angiogénicos parece estar bien caracterizado, la importancia de los mastocitos neoplásicos caninos en la angiogénesis tumoral sigue siendo pobremente entendida (Nakayama *et al.*, 2005).

En el trabajo realizado por Amorim *et al.*, se demostró que los tres grados de mastocitomas no difirieron en la proporción o intensidad de VEGF en la inmunotinción (Amorim *et al.*, 2010). Esto sugiere que VEGF no es un biomarcador adecuado para la malignidad en mastocitomas caninos y tampoco se esperaría que tuviera utilidad como predictor de resultados clínicos (Amorim *et al.*, 2010). Se ha encontrado además, que VEGF se expresa en mastocitomas independientemente del grado histológico (Rebuzzi *et al.*, 2007). El alto nivel de expresión de VEGF en todos los mastocitomas puede indicar la agresividad de esta neoplasia, independientemente del grado histológico (Rebuzzi *et al.*, 2007). El número elevado de mastocitos neoplásicos que fueron positivos a VEGF y PGE-2 en el estudio de Amorim, se debe probablemente a la producción normal de estas proteínas en células no neoplásicas (Szukiewicz *et al.*, 2005). Las células cebadas neoplásicas pueden mantener la producción basal normal de estas proteínas. En los mastocitomas de grado III se ha observado una mayor intensidad de tinción de PGE-2 en la inmunohistoquímica. Como PGE-2 tiene un papel importante en la proliferación celular, la inducción de apoptosis e inmunosupresión, este hallazgo está de acuerdo con el comportamiento biológico más agresivo observado en mastocitomas grado II y III, al compararlos con los tumores de grado I (Lupulescu, 1996). También se sabe que la prostaglandina E2 ejerce un efecto directo sobre el crecimiento tumoral a través de la angiogénesis, que es mediado por VEGF (Liu *et al.*, 2002). El hecho de que los tumores de grado II y III tengan niveles comparativamente más altos de PGE2, pero no de la producción de VEGF, sugiere la presencia de citoquinas adicionales que pueden contribuir a la inducción de la producción de VEGF en mastocitos. Como se ha mencionado, las mastocitos son células inflamatorias primarias que son importantes para la angiogénesis durante la inflamación aguda y reparación. Los mastocitos neoplásicos pueden mantener esta capacidad para su ventaja biológica (Amorim *et al.*, 2010).

RESPUESTA INMUNE A LAS NEOPLASIAS

A pesar de que las células cancerosas pueden derivar de sus propios tejidos, siendo resultado de una transformación maligna, es probable que estas células expresen moléculas de superficie extrañas (antígenos tumorales) para el sistema inmunológico, y por consiguiente, se produzca una respuesta inmunológica en contra de ellas. La expresión de estos antígenos puede asociarse con la alta frecuencia de mutaciones genéticas, trayendo como consecuencia la expresión génica desregulada de proteínas que por lo general no se expresan, o bien de proteínas anormales. También los tumores de origen viral (virus oncogénicos) pueden expresar proteínas virales. Por lo tanto, los productos de genes mutados, desregulados o virales pueden ser reconocidos por los linfocitos B o T. También puede suceder que estos antígenos tumorales no induzcan una respuesta inmune debido a que nunca se expresaron antes del desarrollo de las células neoplásicas o bien se expresaron a niveles basales induciendo tolerancia inmunológica. Por otro lado, las mutaciones génicas también participan en la síntesis tumoral de moléculas no proteínicas, como carbohidratos y lípidos, que pueden ser reconocidos como antígenos por las células B, o bien pueden ser reconocidas por células efectoras de la inmunidad innata, como las células NK. Se han podido establecer patrones de expresión diferencial de los antígenos tumorales, entre los distintos tumores, y entre los tumores y los tejidos normales. Así, los antígenos tumorales se clasifican en función de estos patrones de expresión:

- 1) Antígenos tumorales específicos, que son aquellos que sólo se expresan en células cancerosas pero no en tejidos normales, por lo que estos antígenos por lo general evocan respuestas inmunes del huésped al ser reconocidos como extraños.
- 2) Algunos antígenos tumorales se expresan de manera simultánea en células cancerosas como normales, y la expresión puede o no estar restringida al tipo de tejido que originó el tumor. Estos antígenos se conocen como antígenos asociados a tumor. A pesar de que estos tumores pueden llegar a inducir una respuesta inmune por parte del huésped, por lo general esto no ocurre debido a la tolerancia a lo propio.

Existen otras formas de clasificar a los antígenos tumorales, considerando la capacidad de inducir una respuesta inmune celular por linfocitos T o de tipo humoral por anticuerpos, o bien por su estructura molecular y la naturaleza química de los antígenos:

- a) Productos de oncogenes y genes supresores de tumores. Los productos génicos de oncogenes y de genes supresores de tumor, se sintetizan, son procesados y presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC I), de la misma manera que lo realizan con las proteínas endocitadas y citosólicas, los

péptidos resultantes del procesamiento son presentados y reconocidos por linfocitos T CD8+, donde la mayoría son de tipo citolítico (LTC). Los péptidos de origen tumoral, también pueden ser presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II), lo cual sucede cuando las células tumorales son fagocitadas por células presentadoras de antígeno, lo que dará como resultado la activación de células T CD4+, de tipo cooperador. Dado que estas proteínas alteradas no son presentadas en células normales, son reconocidas como extrañas. En este sentido, algunos pacientes con cáncer, presentan células T CD4+ y CD8+ circulantes, que responden a productos mutados de oncogenes como RAS, p53 y BCR-ABL.

- b) Productos de otros genes mutados. La transformación maligna de las células tumorales, por lo general implica la inestabilidad genética, por lo que una gran variedad de genes pueden estar mutados, incluyendo genes cuyos productos no están relacionados a la transformación maligna, incluso genes de función desconocida. Empero, todos ellos, pueden en potencia expresar antígenos tumorales.
- c) Expresión aberrante o sobreexpresión de proteínas celulares. Las proteínas que pueden expresarse en células tumorales, no siempre presentan cambios en sus estructura, es decir no están mutadas, pero sí sobreexpresadas, lo que induce la respuesta inmune. Los antígenos tumorales pueden ser proteínas celulares normales, que se expresan de modo anormal en las células tumorales y que inducen una respuesta inmune.
- d) Antígenos tumorales por virus oncogénicos. En los procesos de carcinogénesis animal y humana, se encuentran involucrados una gran cantidad de virus tanto ADN como ARN, los cuales en alguna etapa de su ciclo de infección, utilizará a la célula huésped para la síntesis de sus ácidos nucleicos y de sus proteínas esenciales como la cápside, estas últimas pueden estar inmersas en la pared celular del huésped y ser reconocidas por el sistema inmune. Algunos antígenos virales son buenos inmunógenos.
- e) Antígenos oncofetales. Son proteínas antigénicas expresadas en células normales durante el desarrollo embrionario, pero no en tejidos adultos o maduros. Por lo regular, los genes que codifican para estas proteínas son inhibidos o silenciados luego del desarrollo embrionario, sin embargo, cuando las células sufren un proceso de transformación maligna, los genes que estaban reprimidos pueden volver a activarse y por lo tanto, expresarse de nuevo en los tejidos tumorales adultos. La importancia de estos antígenos, es que son marcadores útiles en el diagnóstico y

seguimiento de tumores. No hay evidencia de que sean blancos de la inmunidad antitumoral.

- f) Glucolípidos y glucoproteínas alteradas en la superficie celular. En la superficie celular normal, existe una gran variedad de proteínas que tienen modificaciones postraduccionales como es la adición de lípidos o carbohidratos, por lo tanto, es común que los tumores de origen animal y humano, también expresen altos niveles de glucoproteínas y lipoproteínas alteradas. Por lo general, este tipo de antígenos induce una respuesta inmune de tipo humoral, por lo que los anticuerpos generados reconocen algunos péptidos unidos a carbohidratos. Aun cuando la mayoría de los epítopes que reconocen estos anticuerpos no son específicos de las células tumorales, estos se encuentran en altos niveles si se comparan con la de tejidos normales.
- g) Antígenos específicos de diferenciación celular. Todas las células normales presentan en su superficie proteínas específicas de la línea celular de la que proceden y en algunos casos las células tumorales expresan las proteínas de la línea celular de la cual proceden. Estas proteínas de superficie son llamadas antígenos de diferenciación, ya que son específicas de líneas celulares particulares o de diferentes estadios de maduración de una línea celular. La importancia de estos antígenos es que permite identificar el tejido de donde se originó el tumor.

Existe una respuesta inmune celular y humoral en contra de los antígenos tumorales y algunos de estos mecanismos de defensa son innatos y otros inducidos.

Los mecanismos innatos son la primera línea de defensa del organismo, ya que su actividad no requiere sensibilización previa. Actúan desde el primer momento, cuando el número de células transformadas es pequeño, y actúan sobre diversas poblaciones de células neoplásicas, con independencia de estirpe, origen o inmunogenicidad.

En los mecanismos celulares participan varios tipos celulares, con actividad no restringida por el MCH y con el potencial de ser estimuladas por linfocinas. Las células NK a nivel inmunofenotípico son positivas para los antígenos de superficie CD 56 y CD 16 (este último receptor de baja afinidad para el Fc de la Ig) y no tienen marcadores fenotípicos T ni B. son muy efectivas contra células neoplásicas con baja expresión de antígenos MHC clase I. esto, entre otros mecanismos se debe a que presentan un receptor inhibitor llamado KIR (killer inhibitory receptor) que al interactuar con moléculas MHC clase I, inhibe la actividad citotóxica de estas células. Este mecanismo inhibiría la actividad citotóxica contra células normales, en cambio las células tumorales al expresar menor cantidad de moléculas MHC I

serían destruidas por las NK. Esto último es importante porque el déficit de moléculas MHC permite a las células tumorales escapar del reconocimiento por linfocitos T.

La actividad citotóxica de las NK incluye mecanismos basados en la lisis celular y en la inducción de apoptosis. Además de la citotoxicidad directa, las NK pueden producir factores solubles citotóxicos como TNF α e INF γ . También participan de la citotoxicidad mediada por anticuerpos, ya que tienen receptores para el Fc de las Ig.

Las células LAK (del inglés lymphokine activated killer) son capaces de lisar numerosas líneas tumorales una vez activadas por IL-2. Presentan un fenotipo NK, por lo que se las considera NK activadas.

Los macrófagos poseen una capacidad tumoricida muy alta una vez que son activados por linfocinas como el INF γ . Una vez activados presentan mayor capacidad para adherirse a células neoplásicas y para producir factores citotóxicos como proteasas, TNF α , peróxido de oxígeno. El TNF α al unirse a receptores de superficie de la célula tumoral, puede producir su muerte en forma directa, además de actuar sobre los vasos tumorales en donde induce trombosis e isquemia del tejido neoplásico.

En cuanto a los mecanismos humorales, se sabe existen en el suero anticuerpos naturales producidos sin una inmunización previa, son de tipo IgM y poli-reactivos. Son capaces de reconocer antígenos tumorales y su mecanismo efector tal vez implique a células con receptores para Fc de la Ig, como los macrófagos y las NK.

Los mecanismos celulares involucran a los linfocitos T. los linfocitos T CD4+, pueden ser activados por APC, que expresan MHC clase II, junto a péptidos derivados de las células tumorales fagocitadas. Algunos tumores expresan moléculas de MHC clase II, pudiendo activar de modo directo a los linfocitos CD4+. Si bien estas células no son citotóxicas, una vez activadas, gracias a la producción de citosinas pueden expandir y activar otras células efectoras antitumorales, como linfocitos T citotóxicos, macrófagos y NK.

Los linfocitos T citotóxicos, en general CD8+, reconocen al antígenos asociado a moléculas MHC clase I por medio de su receptor específico TCR. El mecanismo por el que se produce la muerte es igual que las NK, es decir por lisis y por apoptosis, mediante perforinas, granzimas y el sistema FAS/FAS-L. Se han encontrado linfocitos infiltrantes de tumor, conocidos con las siglas TIL, que fenotípicamente corresponden a linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos B, con colaboración de linfocitos T, pueden responder frente al tumor produciendo anticuerpos específicos contra sus antígenos. Los anticuerpos pueden actuar activando el complemento y a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) interaccionando con receptores Fc en células efectoras como macrófagos, NK y LTC.

A pesar de que los tumores pueden ser reconocidos como extraños por el huésped y la inmunovigilancia limita el crecimiento, es evidente que el sistema inmune no impide la aparición de células cancerosas.

El proceso de evasión de la respuesta inmune, se denomina escape tumoral y puede ser asociado a diversos factores:

1. Reducción o modificación de las moléculas clase I del MHC.
2. Incapacidad para activar linfocitos T CD4+, la mayoría de las células tumorales no expresan moléculas MHC clase II, por lo tanto no pueden activar por sí células T cooperadoras. La única vía para activarlos es que los macrófagos infiltren el tumor, fagociten la célula tumoral y presenten los antígenos en sus moléculas de clase II y activen a los CD4+.
3. La falta de factores coestimuladores o de cofactores como B7, o de adhesión como ICAM y LFA-3 hace ineficaz la presentación antigénica. Además, la presentación de antígenos tumorales en ausencia de coestimulación, puede llevar a tolerancia periférica por mecanismo de anergia clonal.
4. Las células cancerígenas pueden producir factores inmunosupresores como TGF β o IL-10, ambos son potentes citosinas inhibitoras de la respuesta inmune.
5. La tolerancia inmunológica hacia los antígenos tumorales puede inducirse en la etapa neonatal.
6. La modulación de antígenos en la superficie de las células malignas está asociada a la unión de anticuerpos. Si el anticuerpo se une a la célula, esta no será capaz de activar el complemento ni de ser reconocido por receptores para Fc de células efectoras, por lo tanto esta interacción antígeno anticuerpo será protectora para la célula tumoral. La modulación antigénica, es un problema que complica la inmunoterapia pasiva con anticuerpos antitumorales.
7. El rápido crecimiento de las células tumorales y el tamaño de la masa tumoral pueden favorecer la aparición de células cancerígenas resistentes a la respuesta inmune, además de que por sí mismo la gran cantidad de células tumorales sobrepasará la capacidad de la respuesta inmune.
8. La respuesta inmune por lo general tendrá como células blanco, las células más susceptibles por lo que inducirá la selección de clones resistentes.
9. Las células tumorales pueden incrementar su resistencia a la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral, al modificar o disminuir la expresión del receptor de TNF- α .

10. Algunas células cancerosas recubren sus antígenos proteicos de superficie con ácido siálico presente en los mucopolisacáridos, produciendo un enmascaramiento antigénico. Otro mecanismo de enmascaramiento es al activar el sistema de la coagulación y cubrirse de fibrina para evitar el reconocimiento.

MASTOCITOMAS

Existen dos tipos de procesos diferentes en los mastocitos: reactivo y neoplásico. Los agregados no neoplásicos ocurren en ciertas condiciones, sobre todo en las reacciones inflamatorias de naturaleza alérgica (Weiss, 1965). El término mastocitosis es frecuentemente utilizado para referirse a procesos reactivos. Sin embargo, dicho término, suele utilizarse para referirse a un proceso multifocal maligno, sobre todo si se acompaña con una leucemia mastocítica. Por tal motivo, es que debería evitarse el uso de dicho término. El tumor de mastocitos es uno de los tumores más comunes de la piel del perro. Se ha estimado que el tumor de mastocitos representa el 6% de todos los tumores en el perro (Lombard *et al.*, 1963) y el 20 al 25% de los tumores cutáneos y subcutáneos (Bostock, 1989). La causa que da origen a los mastocitomas en el perro es desconocida. En raras ocasiones se han asociado a inflamaciones crónicas y a sustancias irritantes. Recientemente se han encontrado mutaciones en el proto-oncogen c-Kit en más de la mitad de los perros con mastocitomas. Los mastocitos son una población de células heterogéneas originadas de células madres en la médula ósea. Kit es el receptor del factor de células madres y está contenido en el proto-oncogen c-kit. La interacción entre el factor de células madres y el Kit es necesaria para la diferenciación, supervivencia y funcionalidad de los mastocitos. La mutación en el c-Kit lleva a la activación del Kit en ausencia del factor de células madre, lo cual provoca una proliferación incontrolada de los precursores de los mastocitos. La presencia del c-Kit puede ser utilizado como un marcador inmunohistoquímico en el mastocitoma canino.

Los mastocitomas se pueden presentar en cualquier raza, aunque bien se sabe existe una predisposición racial en razas braquicefálicas, como lo son el Boxer, Bulldog, Boston Terrier, también pueden desarrollarse en otras razas tales como Schnauzer, Shar Pei, Labrador Retriever. Afecta generalmente perros de edad avanzada, con un promedio de aproximadamente 8 años, aunque existe un rango de 4 meses a 18 años (Hottendorf y Nielsen, 1967). En general las razas braquicefálicas tienden a desarrollar mastocitomas de comportamiento menos agresivo (mastocitomas de bajo grado), mientras perros de raza Shar Pei (*figura 8*), particularmente perros jóvenes, están predispuestos a desarrollar mastocitomas pobremente diferenciados y de comportamiento biológico agresivo (alto grado).

La apariencia clínica del mastocitoma puede ser muy variada y asemejarse a numerosas lesiones cutáneas, de etiología tumoral o no. Por ello, muchos autores denominan a este tumor como “*el gran imitador*”. No hay una presentación típica para el mastocitoma canino. El aspecto macroscópico puede ser similar al de cualquier otro tumor cutáneo y el mastocitoma debería ser considerado en el diagnóstico diferencial de cualquier tumor de piel. Los mastocitomas pueden variar su conducta desde tumores de bajo grado con lento crecimiento que siguen un curso benigno hasta aquellos tumores malignos invasivos y de



Figura 8: Manifestación de un tumor de células cebadas de alto grado de malignidad, expresado en la cara de un ejemplar de raza Shar Pei. (Simon y Bernard, 2012)

rápido crecimiento, existiendo muchos estadios intermedios.

Los tumores de mastocitos pueden involucrar cualquier región del cuerpo. Los cuartos traseros son los sitios más comúnmente involucrados, particularmente el muslo, ingle y escroto. Aproximadamente un 25% de perros con mastocitomas cutáneos son múltiples (Nielsen, 1952; Orkin y Schwartzman, 1960). Los tumores primarios extracutáneos son raros (Patnaik *et al.*, 1982). Se han observado en la cavidad nasal, nasofaringe, laringe, tráquea, y ganglios linfáticos intrabdominales (Bostock 1973, Iwata *et al.*, 2000, Rothwell *et al.*, 1987). La presentación más común es la de una masa cutánea solitaria, pequeña elevada, firme, bien definida que puede estar eritematosa, alopecica y/o ulcerada, sin embargo, también pueden aparecer como masas poco definidas y suaves, involucrando el tejido subcutáneo dificultándose distinguirse con otro tipo de neoplasia únicamente por la apariencia clínica (*figura 9*), a menos que se realice una biopsia para confirmar el diagnóstico.



Figura 9: Izquierda; imagen de un mastocitoma cutáneo de alto grado de malignidad (grado III); nótese que la masa tumoral se encuentra ampliamente ulcerada.; Derecha; múltiples masas tumorales ubicadas en hocico de un canino raza Bóxer. (Simon y Bernard, 2012)

Varían de 1 a 10 centímetros de diámetro, pero ocasionalmente se han observado tumores más grandes. La superficie al corte del tumor es típicamente blanca grisácea, pero puede ser de color marrón o gris. Los mastocitomas bien diferenciados tienden a ser solitarios, de 1 a 4 cm de diámetro y crecimiento lento. Tienden a no estar ulcerados, pero puede haber pérdida de pelo alrededor. Los tumores poco diferenciados tienden a crecer rápidamente, a ulcerarse y suelen tener gran tamaño y límites imprecisos. Los tejidos a su alrededor pueden estar inflamados y edematosos (Mullins *et al.*, 2006, Tams y Macy 1981, Van Pelt *et al.*, 1986). Aquellos tumores de grado intermedio suelen estar entre los dos extremos. En ocasiones se puede presentar en forma múltiple, y en casos avanzados los tumores pueden desarrollarse hasta formar tumores grandes o aparecer como una inflamación difusa de extensas zonas cutáneas y subcutáneas. La presencia de linfadenopatía, causada por el desarrollo de metástasis es común en neoplasias de comportamiento agresivo, aunque también llega a presentarse en mastocitomas de bajo grado. Es por esto que los nódulos linfáticos regionales deben ser evaluados cuidadosamente, aun cuando se consideren de tamaño normal. Es normal la presencia ocasional de células cebadas en nódulos linfáticos normales o reactivos, empero, se debe tener cautela con la determinación de metástasis; generalmente las células cebadas malignas en nódulos linfáticos tienden a presentarse en agregados y no como células únicas aisladas. La tasa de metástasis es baja, pero existe un patrón típico en el sistema reticuloendotelial, con metástasis en ganglios, bazo, hígado y médula ósea. Generalmente la metástasis sistémica es el resultado de un tumor cutáneo primario, aunque puede ocurrir

como un síndrome independiente. En estos casos se observa linfadenopatía, esplenomegalia y puede haber derrame pleural y ascitis. Esta presentación al igual que la leucemia de mastocitos es muy poco frecuente en perros y gatos. Debido a su comportamiento impredecible, pueden estar presentes durante muchos años antes de diseminarse. El desarrollo de metástasis pulmonar es muy poco común en mastocitomas.

La manipulación mecánica durante el examen físico del tumor puede causar desgranulación de las células cebadas, produciendo eritema e inflamación. Este fenómeno es conocido como “signo de Darier” (figura 10). El propietario puede comentar que el tumor se agranda de



Figura 10: fotografía que muestra el eritema y formación de roncha alrededor de la lesión tumoral, posteriormente a la manipulación del mastocitoma cutáneo. Este fenómeno es el resultante de la liberación de aminas vasoactivas de gránulos de las células cebadas, este proceso se conoce como “Signo de Darier”. (Withrow & Mac Ewen’s, 2013)

repente y luego disminuye de tamaño durante un período de 24 horas. Este antecedente debería aumentar la sospecha por mastocitoma.

Aparte de los efectos directos del tumor de células cebadas en el perro, varios problemas relacionados pueden desarrollarse, incluyendo úlceras gástricas y duodenales, glomerulitis focal, alteración de la respuesta inmune y alteraciones en la coagulación. Así mismo, en la evaluación de caninos con mastocitomas se ha encontrado eosinofilia que se explica por la IL-5 liberada a partir de las células cebadas, la anemia que se presenta en algunos casos es consecuencia de alteraciones gastrointestinales y esplenomegalia (Cayate *et al.*, 1995).

Howard *et al.*, (1969) observaron úlceras por encima del 80% de perros con este tumor. Las úlceras ocurren más a menudo en el estómago, menos en el duodeno y normalmente son múltiples. Las lesiones observadas han variado desde pequeñas erosiones precisas a grandes úlceras perforadas que producen peritonitis fatal aguda. El conocimiento exacto de la patogénesis de las ulceraciones gastroduodenales no es del todo conocido, se piensa que está relacionada a la liberación de histamina por los mastocitos. La actividad ulcerogénica de la

histamina probablemente está relacionada al estímulo de receptores H₂ de células parietales gástricas que causan un marcado aumento en la acidez gástrica (Tams y Macy, 1981).

La glomerulitis focal fue observada en aproximadamente en el 70% de los casos de mastocitomas por Hottendorf y Nielsen (1968). La glomerulitis fue caracterizada por una infiltración pericorpuscular de células plasmáticas, acumulaciones focales de un material amorfo eosinofílico, en la membrana basal del capilar glomerular y engrosamiento de la cápsula de Bowman.

Para abordar un diagnóstico hacia el mastocitoma, como para así también a otras formaciones neoplásicas sospechosas, todos los perros deben ser evaluados con una base de datos mínima que incluye un hemograma, química sanguínea y examen general de orina. El hemograma completo puede revelar anemia o desvío a la izquierda (regenerativo o degenerativo) sugestivos de sangrado o perforación gastrointestinal respectivamente. Los pacientes con mastocitosis sistémica en ocasiones tienen eosinofilia y basofilia periféricas, además de grandes cantidades de células cebadas circundantes. Aunque las radiografías torácicas están indicadas como parte de la evaluación general y establecimiento del estado clínico, como bien se mencionó anteriormente, el desarrollo de metástasis pulmonar es muy poco común en mastocitomas, sin embargo, son de utilidad para establecer posible linfadenopatía intratorácica esternal, hiliar o mediastínica. Es una práctica común de los médicos veterinarios clínicos realizar el diagnóstico de mastocitoma mediante citología por aspiración con aguja fina, pero se debe tener en cuenta que en mastocitomas pobremente diferenciados pueden presentar pocos gránulos pequeños pobremente teñidos o incluso, no presentarlos. Los grados reportados citológicamente, pocas veces corresponden con los grados establecidos histopatológicamente, por lo que el grado siempre debe ser establecido por histopatología. Es por esto que el diagnóstico histológico es esencial y de suma importancia para confirmar el diagnóstico, grado histológico y determinación de márgenes quirúrgicos. Cabe destacar que la presencia de mastocitos en la piel de una biopsia no es indicativa de neoplasia ya que son células que pueden encontrarse incluso ante una respuesta inflamatoria no cancerosa.

Se han utilizado varios sistemas de clasificación para mastocitoma, y entre ellos, la más utilizada ha sido el sistema de Patnaik, en el cual se clasifica dichos tumores en 3 grados según las características histológicas que incluyen celularidad, morfología celular, invasividad, actividad mitótica y reacción estromal (Patnaik *et al.*, 1984). De acuerdo con esta clasificación, los mastocitos bien diferenciados (grado I) llevan un excelente pronóstico a largo plazo y generalmente son curados por cirugía en un 95% de los casos, mientras que los mastocitomas mal diferenciados (grado III) son localmente invasivos y tienen más

probabilidades de metástasis, por lo que la quimioterapia se recomienda además de la cirugía. Por el contrario, el comportamiento de los mastocitomas intermedios (grado II) es más difícil de predecir. La mayoría de los grado II son solucionados con amplia resección quirúrgica, pero entre el 5% y 22% metastizan o recurren (Blackwood *et al.*, 2012).

- **Grado I;** bien diferenciado. Posee células cebadas bien diferenciadas con bordes citoplasmáticos bien definidos y núcleo regular redondo u oval, figuras mitóticas ausentes o muy infrecuentes, gránulos grandes, abundantes y de tinción profunda y las células neoplásicas confinadas a la dermis y espacios foliculares.
- **Grado II;** moderadamente diferenciado. Células agregadas de manera cercana con pobre distinción de márgenes citoplasmáticos, relación núcleo/citoplasma disminuida, figuras mitóticas infrecuentes, presencia de gránulos variable con cierta disminución en cantidad, las células neoplásicas infiltran o reemplazan al tejido subdérmico y subcutáneo.
- **Grado III;** pobremente diferenciado. Existe celularidad alta, pobre distinción de márgenes citoplasmáticos, núcleo de tamaño variable e irregular, figuras mitóticas frecuentes, gránulos citoplasmáticos disminuidos en número o ausentes, las células neoplásicas reemplazan el tejido subcutáneo y tejidos frecuentes.

Para mejorar la concordancia entre patólogos y reducir la incertidumbre pronóstica del grado intermedio, se propuso un sistema de clasificación histológica de 2 niveles en 2011 por Kiupel *et al.*, 2011). Según el sistema de Kiupel, el diagnóstico de un mastocitoma de alto grado se caracteriza por contener cualquiera de los siguientes criterios:

- Al menos 7 figuras mitóticas en 10 campos de alta resolución
- Al menos 3 células multinucleadas en 10 campos de alta resolución
- Al menos 3 núcleos extraños en 10 campos de alta resolución y cariomegalia

Todos otros tumores se consideran de bajo grado (Kiupel *et al.*, 2011).

Además del diagnóstico y clasificación de los mastocitomas por histopatología, se debe clasificar el estadio clínico, este es de importancia para establecer el pronóstico, sin embargo no siempre se refleja el comportamiento biológico de la neoplasia. Por ejemplo, aunque en general el encontrar evidencia de metástasis a un nódulo linfático regional se considera como un factor pronóstico negativo, se ha encontrado que en el caso de mastocitomas de bajo grado, a pesar de presentar metástasis al nódulo linfático regional, presentan tiempos largos de sobrevivencia cuando se realiza un control local adecuado de la neoplasia y nódulo linfático adecuado (cirugía o radioterapia). El estadio clínico del mastocitoma en el perro, puede clasificarse de la siguiente manera, según la Organización Mundial de la Salud;

- **Estado clínico I:** neoplasia confinada a la dermis sin nódulos linfáticos afectados. (*imagen 11*)
- **Estado clínico II:** neoplasia confinada a la dermis con implicación de nódulos linfáticos regionales.
- **Estado clínico III:** múltiples neoplasias dérmicas o una neoplasia grande (>3 cm) e infiltrada, con o sin afección de los nódulos linfáticos regionales. (*Imagen 12*)
- **Estado clínico IV:** cualquier neoplasia con metástasis distante.
- **Subestado a:** cualquier estado clínico con signos sistémicos ausentes.
- **Subestado b:** cualquier estado clínico con signos sistémicos presentes.



Figura 11: La imagen muestra una estructura neoplásica, redondeada, bien circunscripta, ubicada en piel de escroto de un canino, de raza Mastín Napolitano. En la evaluación histopatológica se concluyó un mastocitoma grado II.

Cortesía de MV MSc, Alcoba A., MV, Segui MM.



Imagen 12: Obsérvese la imagen que muestra numerosas estructuras neoplásicas ubicadas en piel de zona inguinal de un canino macho, de raza Dogo Argentino. Estas neoformaciones se correlacionan con un mal pronóstico en los mastocitomas cutáneos. En la evaluación histopatológica se diagnosticó mastocitoma grado III

Cortesía de MV MSc, Alcoba A., MV, Segui MM.

MASTOCITOMA Y MARCADORES MOLECULARES

Una particularidad de los mastocitomas es la posible determinación de los diferentes patrones de expresión del receptor c-Kit de inmunohistología (da Costa *et al.*, 2007). Por otro lado, el antígeno Ki-67 es una proteína nuclear muy asociada a las fases de mitosis y, por ello, se emplea como un marcador de la proliferación. Los estudios histológicos e inmunohistológicos (c-kit, antígeno Ki-67), así como los análisis genéticos nos van a aportar mayor exactitud en la caracterización y en el pronóstico (Welle *et al.*, 2008).

El receptor c-Kit es un receptor tirosinquinasa tipo III, también llamado CD117. Este receptor aparece de forma fisiológica en diversos tejidos, como por ejemplo en células madres hematopoyéticas, tejido epitelial, melanocitos, en ovarios y testículos y en partes del cerebro (Morini *et al.*, 2004). La expresión del c-Kit también aparece en tumores procedentes de estos tejidos. En un estudio inmunohistológico, los mastocitos normales muestran un patrón de expresión del c-Kit tipo 1.

Se ha demostrado que un fuerte predictor del tiempo de supervivencia, tiempo de recurrencia local y metástasis fue el índice mitótico (IM), evaluado como el número de figuras mitóticas por diez campos de alta potencia (Thompson *et al.*, 2011). El IM es una prueba de pronóstico valiosa (Elston *et al.*, 2009; Romanski *et al.*, 2007) y una parte fundamental del esquema de clasificación para el mastocitoma cutáneo (Bostock, 1973; Gross *et al.*, 2005; Patnaik *et al.*, 1984). A pesar de esto, hay inconvenientes al usar el IM como único determinante para la evaluación de proliferación celular, y esto se debe a que el recuento preciso de figuras mitóticas puede estar influenciado por la selección de campo, plano de sección, diámetro del campo, intensidad de la granularidad citoplasmática (o presencia de aplastamiento del artefacto), necrosis y/o células apoptóticas.

Todas estas variables pueden contribuir al desacuerdo entre observadores. Además, el índice mitótico solo detecta células en la fase mitótica en lugar del crecimiento completo (es decir, todas las células activas dentro del ciclo celular). Para abordar estos problemas, se han realizado muchos estudios que han evaluado el uso de ensayos de proliferación celular adyuvante, incluyendo tinción histoquímica para las regiones de organización nucleolar argirofílicas (AgNOR) (Bostock *et al.*, 1989; Kravis *et al.*, 1999; Maglennon *et al.*, 2008) e inmunohistoquímica para Ki67 (Abadie *et al.*, 1999; Scase *et al.*, 2006; Webster *et al.*, 2007). La proteína nuclear Ki67 se expresa en todas las etapas del ciclo celular, pero no está presente en las células no cíclicas, por lo tanto, la expresión de Ki67 se puede utilizar para evaluar la fracción de crecimiento tumoral.

Por otro lado, las regiones organizadoras nucleolares argirofílicas (AgNOR) se presentan en el núcleo, captan colorantes argénticos y son una medición indirecta de la proliferación celular. AgNOR, son subunidades nucleolares involucradas en la transcripción de ARN, y el

número de éstas presentes por célula está asociado con la tasa de proliferación celular (Webster *et al.*, 2007). El número promedio de AgNOR/célula se correlaciona bien con el grado tumoral en especímenes de histopatología (Bostock *et al.*, 1989; Kravis *et al.*, 1996), y parece ser un predictor independiente de la muerte relacionada con el tumor (Bostock *et al.*, 1989). En un estudio, el recuento de AgNOR fue más alto en perros que experimentan enfermedad metastásica (Simoes *et al.*, 1994).

Otro método para medir la proliferación celular, coloración para el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), también fue predictor de metástasis y escasa supervivencia en perros con mastocitoma cutáneo (Simoes *et al.*, 1994). La asociación entre PCNA y tiempo de supervivencia fue menos evidente en otro informe (Abadie *et al.*, 1999). Los autores de una investigación propusieron el uso combinado del grado microscópico, AgNOR y PCNA, para determinar el pronóstico. Aplicando tal modelo, el pronóstico exacto no pudo ser establecido para el 20% de los perros con tumor de células cebadas, destacando la heterogeneidad de esta enfermedad (Simoes *et al.*, 1994).

TRATAMIENTOS

El control del mastocitoma canino consiste en el uso de cirugía, quimioterapia o terapia radiante, ya sea en forma individual o combinada.

La escisión quirúrgica se indica si el mastocitoma es solitario y no hay evidencia de afección ganglionar o diseminación sistémica. La resección debe ser amplia y profunda hasta un margen mínimo de 2-3 cm alrededor de los límites tumorales observados, y un plano fascial por debajo. Con esta modalidad, la recurrencia para los grados 1 y 2 es mínima (Simpson *et al.*, 2004).

Todo el tejido resecado debe ser remitido a patología para determinar la entereza de la escisión quirúrgica. Si el tumor es de grado 1 o 2 y la escisión es completa, no se requiere tratamiento adicional. Una segunda intervención quirúrgica debe incluir el campo previo más márgenes laterales de 2-3 cm y tejido profundo adicional. Si esto no se puede llevar a cabo por la ubicación lesional u otros factores, o si el MTC es de grado 3, se debe indicar la terapia adicional. La quimioterapia puede ser considerada si se detectan metástasis o el MTC es de grado 3. Existen tres estudios que han desafiado el antiguo concepto (Bostock, 1973; Patnaik *et al.*, 1984) que los perros con mastocitoma de grado 2 presentan alta probabilidad de recurrencia local, incluso luego de resecciones en apariencia completas. Estos trabajos demostraron que con cirugías más agresivas y examen histopatológico de los bordes, esta clase de pacientes tenía una tasa de recurrencia local mucho menor y tiempo de supervivencia más prolongado, que lo previamente comunicado. En contraparte, el estudio realizado por Baker-Gabb, *et al.*, 2003, demostró que los tumores de grado 3 tenían mayor probabilidad de ser resecados en forma incompleta y hacer metástasis, que los MTC de grado 1 y 2. La quimioterapia debe ser considerada para los MTC de grado 3.

Como se ha mencionado anteriormente, la enfermedad metastásica es más frecuente en perros con mastocitoma de grado III y en pacientes con resecciones incompletas de los tumores cutáneos (Baker-Gabb *et al.*, 2003).

Los glucocorticoides básicamente son paliativos, pero pueden suceder algunas respuestas a largo plazo. La prednisona (2 mg/kg/día, oral, 2 semanas, luego 1 mg/kg/día, 2 semanas, luego 1 mg/kg/día por medio) se administra en tanto no haya progreso tumoral.

Se desconoce el mecanismo exacto de los efectos citotóxicos sobre los mastocitoma, aunque el proceso puede ser paralelo a la actividad de los glucocorticoides sobre los linfocitos. Los receptores de glucocorticoides se encuentran en el citoplasma de las células cebadas caninas; estos sitios podrían intervenir en la susceptibilidad de los MCT a los corticosteroides (Takahashi *et al.*, 1997). No interesa el tipo de glucocorticoide administrado, pero la aplicación intralesional puede ser más efectiva que la administración sistémica. Pocos

efectos colaterales cushingoides se observan con los glucocorticoides de acción corta, como la prednisona. La duración de remisión por lo usual es de 10 a 20 semanas.

Aunque los receptores para progesterona y estrógenos fueron identificados en las células tumorales de perros con mastocitoma, todavía se debe investigar el rol de los esteroides sexuales en el tratamiento de esta enfermedad.

Las proteínas de resistencia a multidrogas (glucoproteína-p y proteína asociada a resistencia a multidrogas) fueron detectadas en el 25% de los mastocitomas cutáneos caninos. Estas proteínas son importantes en la resistencia de las células tumorales a los glucocorticoides y agentes quimioterápicos, como doxorubicina y vincristina. Ambas proteínas faltaban en los tumores de grado III, lo cual es alentador, porque estas son las neoplasias que con mayor asiduidad requieren quimioterapia (Miyoshi *et al.*, 2002).

Los fármacos que mayor eficacia poseen en el tratamiento de mastocitomas son la vinblastina, lomustina y prednisona. Con prednisona aproximadamente un 20% presentan remisión; generalmente la remisión es parcial y es principalmente atribuible al control de la inflamación y edema peritumoral. Con vinblastina, cuando es utilizada en conjunto con prednisona, es esperado obtener una remisión en 40 a 50% de los casos. La lomustina como único agente causa una remisión en aproximadamente 40% de los casos, siendo parcial en la mayoría de ellos. Sin embargo, al ser utilizada de manera adyuvante a cirugía es mucho más efectiva en alcanzar tiempos de remisión y supervivencias más prolongadas.

CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS

Es importante reconocer que la palabra tumor bien está relacionada con neoplasia, pero el significado original es derivado de la palabra griega para hinchazón. Por esto, recordar que no todos los procesos que producen masas son neoplasias. Las lesiones no neoplásicas se deben distinguir de las neoplasias, ya que hay varios procesos que causan la ampliación del tejido o causan una apariencia histológica anormal que tiene cierto parecido con la neoplasia.

La hiperplasia es un aumento en el tamaño de un órgano o tejido debido a un aumento en el número de células. Pudiendo reconocerse una hiperplasia fisiológica y patológica. La hiperplasia fisiológica ocurre en respuesta a un estímulo conocido, y cesa cuando este se elimina. A diferencia, la hiperplasia patológica implica un aumento en el tamaño del tejido debido a un aumento en la replicación celular, si bien el proceso puede no ser dañino, no es útil para el individuo. El estímulo para la hiperplasia patológica es frecuentemente atribuido a un exceso de factores de crecimiento, pero la causa precisa a menudo suele desconocerse.

La hipertrofia, es un aumento en el tamaño del tejido o del órgano debido a un aumento en el tamaño de la célula. Este proceso, a semejanza de la hiperplasia, también puede dividirse en procesos fisiológicos y patológicos. Las células con la habilidad para dividirse pueden sufrir hipertrofia e hiperplasia en respuesta a las demandas crecientes. Por lo tanto, en muchos tejidos, especialmente endocrinos, un aumento en el tamaño del órgano puede ocurrir como resultado de ambos procesos.

La displasia es un cambio no adaptativo en la apariencia de la célula debido a una pérdida de uniformidad de las células individuales y una pérdida de su orientación arquitectónica. Se puede reconocer a nivel microscópico por atipia citológica que todavía está confinada a sus sitios microanatómicos normales. La displasia generalmente se considera una lesión premaligna, pero no todas las lesiones darán como resultado una neoplasia.

Existen características que distinguen a las lesiones benignas de las malignas. Los cambios característicos en las células malignas incluyen variación en tamaño celular (anisocitosis), variación en tamaño nuclear (anisocariosis), y un aumento de la relación núcleo-citoplasma que se aproxima a 1:1 en lugar de lo normal de 1:4 a 1:6, dependiendo del tipo de célula. Los núcleos pueden ser hipercromáticos, que refleja un aumento en el contenido de ADN anormal (aneuploidía), o pueden tener núcleos vesiculares abiertos indicativos de la transcripción de genes activos. Los nucléolos son a menudo prominentes o múltiples, indicativo de producción activa del ARN ribosomal necesario para la síntesis de proteínas. Las figuras mitóticas tienden a aumentar y a menudo son extrañas. El aumento en las figuras mitóticas se pueden atribuir a una alta proporción de células en el ciclo celular y

posiblemente a la presencia de figuras mitóticas anormales que no pueden completar la citocinesis normalmente y, por lo tanto, siguen arrestados en este estado. Las neoplasias mal diferenciadas por lo general son pleomórficas, caracterizadas por una arquitectura histológica irreconocible y marcadas variaciones en el tamaño y la forma de las células y núcleos. Pueden observarse células gigantes multinucleadas. Éstas, observadas en tumores malignos, se caracterizan por una matriz desorganizada de núcleos a diferencia de las células multinucleadas normales, como por ejemplo los osteoclastos en el que los núcleos están dispuestos de manera ordenada, con una distribución polar.

Los tejidos y los tumores derivados de ellos se dividen según su origen, en mesenquimal o epitelial. Los elementos mesenquimatosos incluyen el tejido conjuntivo, músculo estriado y liso, células sanguíneas y células endoteliales y tejidos relacionados (sinovial, mesotelio y meninges). Las células epiteliales incluyen el epitelio escamoso de la piel, las células que recubren el tracto respiratorio, digestivo, urinario y reproductivo, todas las glándulas (exocrinas y endocrinas), y células de origen neuroectodérmico como los melanocitos. El tejido de origen y el sufijo -oma designa neoplasias mesenquimatosas benignas. Por lo tanto, la neoplasia benigna de fibroblastos es un fibroma. Las neoplasias malignas de origen mesenquimal usan la designación de tejido y el sufijo -sarcoma, por ejemplo entonces, una neoplasia maligna de fibroblastos da origen a un fibrosarcoma. Las neoplasias epiteliales benignas de origen glandular son nombrados por el tejido de origen con el sufijo -adenoma, como en el adenoma mamario. Las neoplasias benignas epiteliales que surgen del epitelio de revestimiento son usualmente llamadas papilomas. El tejido de origen y el sufijo -carcinoma se utiliza para neoplasias epiteliales malignas. Aquellos que hacen glándulas histológicamente evidentes dentro de la neoplasia se denominan adenocarcinomas. Existen algunas excepciones que se encuentran bien establecidas, como por ejemplo el melanoma. Pueden existir alternativas como el uso del término melanoma maligno.

MANEJO DE MUESTRAS

Los patólogos veterinarios cumplen un rol importante en la gestión de las neoplasias de animales de compañía al brindar un diagnóstico preciso a los médicos clínicos para poder determinar un pronóstico y tratamiento adecuado. Tanto el patólogo como el clínico deben trabajar juntos para determinar el tratamiento óptimo para el paciente, ya que el diagnóstico y tratamiento de las neoplasias en medicina veterinaria se han vuelto muy complejos. Ya no es adecuado determinar simplemente si el tumor es benigno o maligno. El tipo de tumor necesita ser identificado con la mayor precisión posible, y deben identificarse los subtipos de tumores debido a la importancia pronóstica. La clasificación de tumores es cada vez más importante porque el comportamiento de algunos tumores puede ser predicho por el grado de la neoplasia. Además, la evaluación de los márgenes para completar la extirpación quirúrgica es muy importante. En algunos casos, la evaluación histológica del tejido tratado preoperatoriamente es importante para predecir el resultado del tratamiento. Existen procedimientos especiales como la inmunohistoquímica (IHC), microscopía electrónica (EM), citometría de flujo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que pueden ser ventajosos en algunos casos para identificar correctamente el tipo de tumor o subtipo o para predecir el comportamiento clínico. La clasificación de las neoplasias en medicina veterinaria se ha vuelto más comúnmente aplicada, y los sistemas se han vuelto más avanzados con aplicación de marcadores moleculares para una clasificación más precisa y mejor información pronóstica.

En cuanto al manejo de la muestra para biopsia, ésta debe ser inspeccionada visualmente por el clínico para ayudar a determinar que se obtuvo el tejido apropiado. La muestra deberá tener un tamaño suficiente y consistencia para que permanezca intacta en formalina y no se pierda en el procesamiento. Las muestras muy pequeñas se pueden perder fácilmente durante el envío o en el procesamiento debido a la contracción de la muestra durante la fijación y el procesamiento. Los recipientes en los que se deposita la muestra deben estar etiquetados adecuadamente antes del envío al laboratorio, ya que durante el transporte pueden cometerse errores y la consecuente mezcla de muestras. Debe destacarse la importancia de incluir por parte de quien remite la muestra, un historial adecuado, adecuada señalización, hallazgos clínicos pertinentes, radiográficos e incluso tratamiento en el caso de instaurado uno. Es una herramienta valiosa proporcionar al patólogo un diagrama de la muestra que indica la posición del tejido en el animal. Para que el patólogo pueda proporcionar un diagnóstico más preciso, se remarca la importancia de la historia que acontece al animal, datos como el tamaño de la masa tumoral, distribución, forma, tiempo de evolución, consistencia, contenido, irrigación, con o sin movilidad, etc. De esta manera, el anatomopatólogo no sólo

puede establecer el diagnóstico histopatológico y clasificación del cáncer, sino también el grado y estadio de enfermedad, siempre que sea posible.

La graduación tumoral es una de las tareas más importantes y proviene de la evaluación subjetiva de las características microscópicas del cáncer, y a menudo se fundamenta en el grado de diferenciación, índice mitótico, grado de pleomorfismo celular o nuclear, cantidad de necrosis, invasión, reacción estromal y respuesta linfoide. Estas características se aprovechan para graduar el tumor como grado bajo (bien diferenciado, grado I), intermedio (moderadamente diferenciado, grado II) o alto (escasamente diferenciado, grado III). Otra de las tareas fundamentales es valorar el éxito de la resección quirúrgica de un tumor, u obtención de márgenes “limpios”. Los bordes limpios son esenciales, prescindiendo del tipo de tumor (benigno o maligno). Los márgenes deben ser revisados en todas direcciones, incluyendo profundidad y ancho. Aunque no sea factible chequear todos los márgenes, el patólogo debe evaluar el tumor en muchas áreas diferentes, para asegurar con confianza que la masa fue removida en su totalidad. Cuanto más anaplásico es un tumor, menos definidos son sus límites, y se requieren márgenes más amplios. Como regla general, los márgenes de 1 mm se consideran incompletos, mientras que los de 1 a 3 cm suelen juzgarse como amplios y limpios. Como ejemplo, un adenocarcinoma mamario bien diferenciado es poco probable que recurra con un margen de 0,5 cm, mientras que los tumores de células cebadas y sarcomas de partes blandas tienen máximo riesgo de recurrencia, porque estas lesiones extienden proyecciones dentro del tejido subyacente.

OBJETIVOS

1-Evaluar el tipo y comportamiento biológico de los mastocitomas en caninos mediante procedimientos clínicos e histopatología.

2- Realizar un estudio retrospectivo de las neoplasias clasificadas como mastocitomas y que han sido evaluadas bajo el sistema de clasificación de Patnaik, y reevaluarlas según la clasificación histopatológica de Kiupel.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio retrospectivo se llevó a cabo con muestras obtenidas de los laboratorios de Patología Animal de la Universidad Nacional de Río Cuarto y del laboratorio privado veterinario LAIVET.

Se revisaron los archivos de patología comprendidos entre los años 2009 y 2017, y se obtuvieron las fichas de los casos diagnosticados por histopatología como mastocitoma en caninos. Aquellos en los que no se incluyó la gradación de dicha neoplasia, se le asignó la correspondiente, siguiendo los parámetros establecidos en la clasificación de Patnaik et al., (1984), según dichos parámetros se puede diferenciar: grado I (bien diferenciado), grado II (moderadamente diferenciado) y grado III (poco diferenciado). Luego de dicha clasificación se procedió a reanalizar las muestras y clasificarlas según la clasificación de Kiupel et al., en la que se puede establecer dos grados; alto grado de malignidad y bajo grado de malignidad. Además, se evaluó la frecuencia de casos de mastocitoma canino según las variables raza (pura y mestizo), edad (menos de un año, uno a cinco años, cinco a nueve años, y mayores de nueve años) y sexo.

Las muestras analizadas procedentes de piel se obtuvieron mediante cirugía, utilizando siempre elementos de corte neto como bisturí y la utilización de elementos de punta roma como pinza de mano izquierda sin dientes, todos estos elementos hacen de una correcta toma de muestra que evita daños en el tejido a la manipulación. Inmediatamente de extraída la muestra, se colocó en formol al 10%, este fijador utilizado se emplea para evitar los procesos de degradación celular como autólisis, conservando de esta manera la muestra intacta. Aquellas muestras de tamaño superior a 1 cm cúbico, se le realizaron cortes foliados para permitir una correcta penetración del formol a la pieza quirúrgica.

Es importante en la toma y remisión de muestras, asegurar una buena preparación del fijador a emplear, en este caso se ha utilizado formaldehído 40%, aplicando 1 volumen de formol y 9 volúmenes de solución tamponada pH 7.4, quedando entonces la concentración final del formol al 10% (formaldehído 4%). Una vez la muestra colocada en frasco hermético, con tapa rosca y de boca ancha, se coloca un volumen de la solución de 30 veces el volumen de la muestra, asegurándonos de esta forma la correcta fijación del tejido.

Luego de fijada la muestra se procede al corte histológico, para esto, luego del adelgazamiento de la muestra se incluye en un medio sólido de parafina, la cual mantendrá la estructura del tejido. Previamente se deberá realizar la deshidratación del tejido, por medio de la cual se extrae completamente el agua de las estructuras celulares, gracias a esto el medio de inclusión puede penetrar la muestra. El aclaramiento hace transparente el tejido sustituyendo el agente deshidratante por una sustancia que puede mezclarse con el medio de inclusión (sustituto de Xileno). La inclusión en parafina, es un procedimiento que se realiza

para preservar la estructura del órgano y darle además, firmeza al tejido, de esta manera la muestra no sufrirá alteraciones al someterla al corte. Posteriormente a la inclusión, el tejido se dispondrá en pequeños bloques de parafina para obtener el taco. Una vez obtenido el taco, se está en condiciones de realizar los cortes de un espesor de 5 a 6 μm con micrótomo Leica®. El montaje de los cortes se realiza sobre un portaobjeto, para luego realizar el desparafinado con pasajes sucesivos por sustituto de xileno y seguido a esto, la rehidratación por medio de pasajes en alcoholes de diferentes graduaciones de menor concentración y por último agua. El paso final del proceso es la coloración de hematoxilina/eosina. La hematoxilina es una sustancia básica que tiñe estructuras ácidas en tonos azul y púrpura, como el núcleo. A diferencia, la eosina es una sustancia ácida que tiñe estructuras básicas en tonos rosados, como el citoplasma. Esto nos permite una correcta y excelente definición de las estructuras celulares. Debido a que este trabajo se basó en el análisis de células cebadas, también se utilizó una tinción especial, Azul de Toluidina para poder realizar una clasificación neoplásica más exacta. Dicha coloración nos permite diferenciar entre neoplasias bien diferenciadas de aquellas pobremente diferenciadas, debido a que las células neoplásicas indiferenciadas poseen pequeña cantidad de heparina, se tiñen de azul con el azul de toluidina (ortocromasia), y las neoplasias con buena diferenciación, poseen mayor cantidad de heparina, tiñéndose de rojo (metacromasia).

Finalmente se aplica un medio de montaje (Entellán®) y se protege el corte con cubreobjetos, así la muestra perdura en el tiempo. La observación microscópica se llevó a cabo con un microscopio trinocular de campo claro Zeiss® modelo Axiostar Plus. La obtención de microfotografías se realizó con cámara Canon® modelo G5.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el período de estudio comprendido entre el año 2009 y 2017, se diagnosticaron 38 casos como mastocitoma cutáneo en caninos. Según la clasificación de Patnaik fueron categorizados en, grado I (bien diferenciados), grado II (moderadamente diferenciados) y grado III (indiferenciados). De los 38 casos, el 42% (16/38) correspondieron a mastocitoma grado I, 42% (16/38) de casos correspondieron a mastocitoma grado II, y el 16% (6/38) se clasificaron como mastocitoma grado III. (*Gráfico 1*).

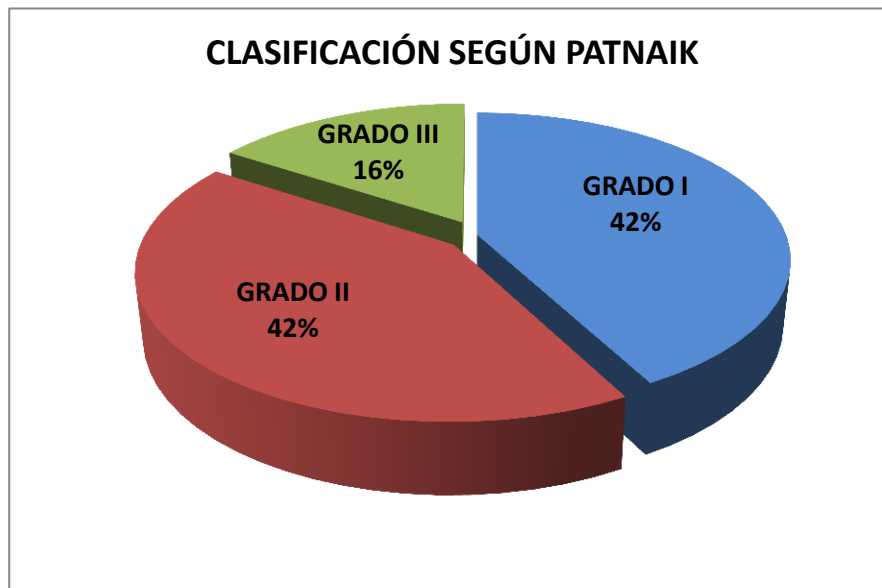
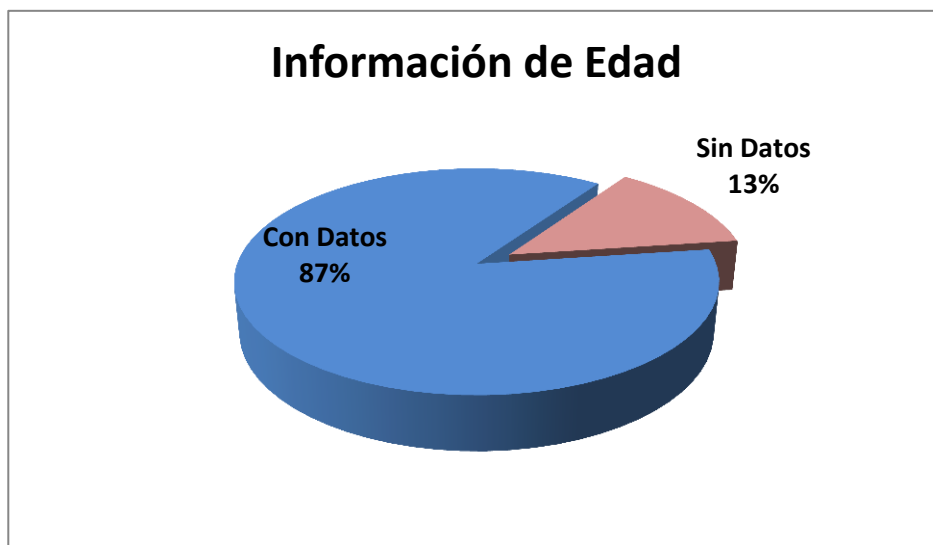


Gráfico 1; ilustra la distribución de las neoplasias luego de ser evaluadas bajo la clasificación según Patnaik, en la que se observa que tanto los mastocitomas de grado I y grado II representan el 42% (16/38), en contra parte los mastocitomas de grado III el 16% (6/38)

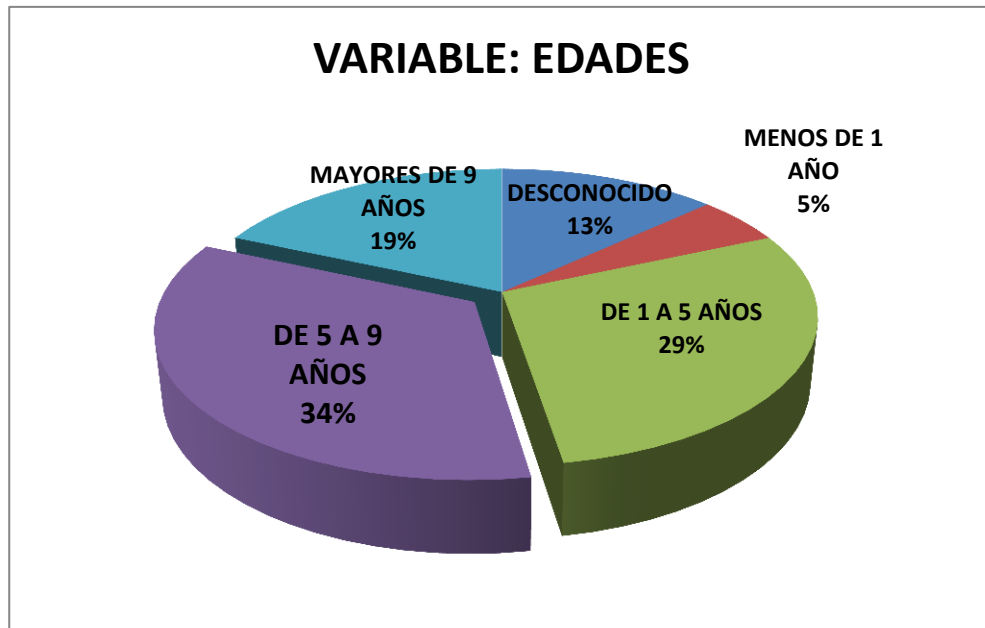
Los mastocitomas de grado I se caracterizaron por el predominio de células redondas a ovales, similares a las células cebadas normales, dispuestas en cordones o pequeños grupos celulares. El citoplasma se caracteriza por ser abundante y bien delimitado, con núcleos grandes redondos y ausencia de figuras mitóticas. Por otro lado, aquellas muestras clasificadas como grado II presentaron un aumento de la celularidad e invasión del tejido cutáneo. El pleomorfismo celular fue mayor, con poco detalle celular y con citoplasma moderado a escaso. El índice de figuras mitóticas fue leve y en algunas áreas se pudo apreciar focos de necrosis y edema. En contraparte, en las neoplasias de grado III se evidenció pérdida casi total del detalle celular. La celularidad fue abundante con pleomorfismo muy elevado y el tejido conectivo completamente invadido en profundidad. Se apreciaron células multinucleadas y abundantes figuras mitóticas, además de extensas áreas de necrosis, hemorragias y edema.

Posteriormente se analizó la distribución de casos según diversas variables, entre las que se destacan: sexo, edad y raza.

Al analizar la variable “edad”, se decidió en primer lugar verificar si todos los casos utilizados disponían de dicho dato. Así, resultó que el 87% (33/38) brindaban la información y el 13% (5/38) no informaban la edad (*Gráfico 2*). Por consiguiente, se trabajó en el análisis de las edades a partir de los casos que disponían la información, resultando que la mayoría de los casos (40%, 13/33) se encontraban en el rango entre 5 a 9 años. A su vez el 33% (11/33) tenían entre 1 a 5 años y el 21% restante (7/33) se distribuían en mayores de 9 años. Un pequeño porcentaje (5%) correspondieron a 2 casos menores de 1 año de edad. (*Gráfico 3*)



El *Gráfico 2* refleja los casos en los que se obtiene el dato de edad, el cual está representado por el 87% (33/38) en contra parte de aquellos en los que se desconoce dicho dato (13%, 5/38). Puede verse la importancia que toma el tener los datos completos de un caso.



El *Gráfico 3* muestra la distribución de casos según la variable "edad". Puede notarse que el gran porcentaje se comprende entre aquellos pacientes de entre 5 a 9 años 34% (13/38), seguido por el 29% (11/38) de aquellos que poseen entre 1 a 5 años de edad.

Como puede observarse en los datos obtenidos, el grupo etario de mayor presentación de mastocitoma canino corresponde para aquellos comprendidos entre 5 a 9 años de edad, siendo coincidente con numerosas publicaciones de diversos autores que afirman que los animales maduros con una media de edad de 8 años tienden a ser los más afectados (Macy, 1985; Shelly, 2003, Misdorp, 2004); sin embargo, puede presentarse a cualquier edad, desde menores de 1 año hasta los 18 años de edad (Pulley y Stannard, 1990).

Al analizar la variable raza, aquellos ejemplares de razas puras fueron los más afectados por esta neoplasia, encontrándose 76 % (29/38). En contraparte, los mestizos representaron el 24% (9/38). (*Gráfico 4*)

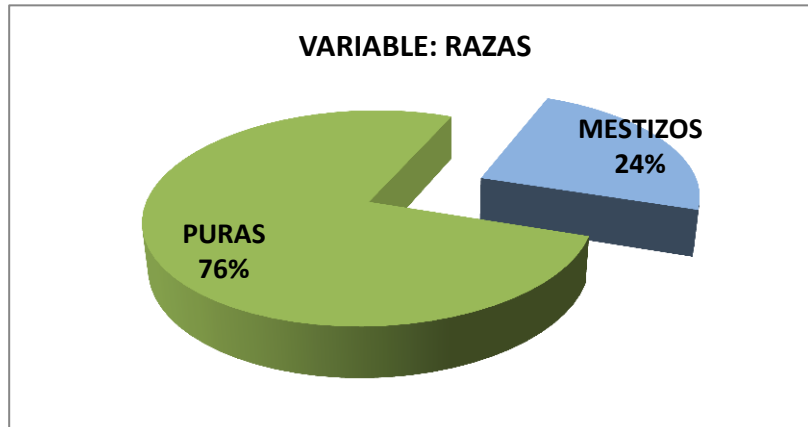


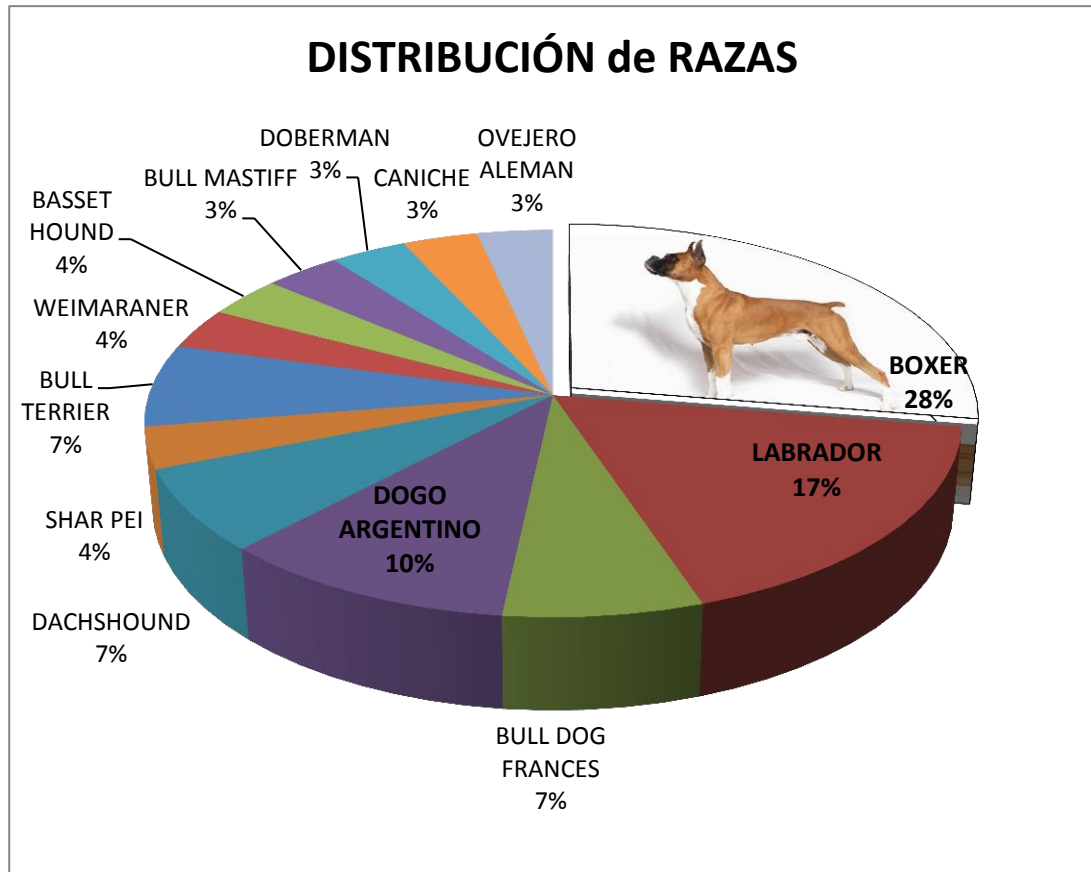
Gráfico 4, queda representado que los animales de razas puras son aquellos que llevan una gran predisposición en padecer la neoplasia, 76% (29/38).

Luego de observar que la mayoría de los casos se encontraban entre ejemplares de razas puras, analizamos las diferentes razas encontradas, y su frecuencia de presentación de la neoplasia bajo estudio. La raza que más casos presentó fue el Bóxer, 28% (8/38), seguida por la raza Labrador Retriever en la que se encontraron 5/38 casos (17%), y un 10% (3/38) se correspondió a la raza Dogo Argentino. Dentro de la raza Bóxer se encontró que 4 casos correspondían a neoplasia de grado I, 3 fueron de grado II y existió un caso de grado III.

En tanto que de los cinco casos observados en la raza Labrador, 3 casos correspondieron a neoplasias de grado I, y los dos casos restantes fueron de grado II.

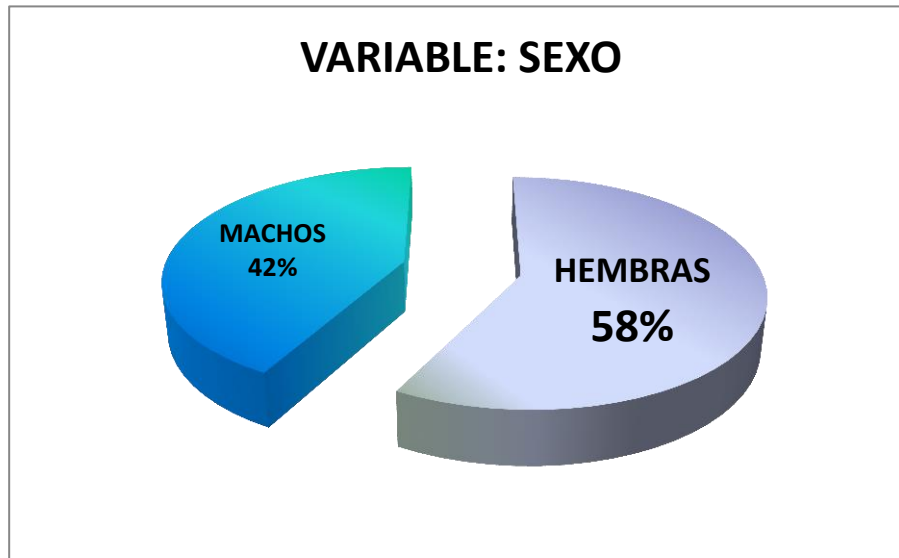
Los demás casos analizados se distribuyeron en razas como Shar Pei, Ovejero Alemán, Caniche Toy, Bulldog Francés, entre otras. (Gráfico 5)

Como se puede observar, la casuística analizada es coincidente con la bibliografía consultada, en la cual se informa que una de las razas de mayor predisposición es la raza Bóxer (Patnaik *et al.*, 1984; Vail, 1996; Fox, 1998; De Nardi *et al.*, 2000), en dichos estudios se encontraron, además, otras razas con un gran número de casos (Boston Terrier, Bull Terrier, Labrador Retriever, Fox Terrier, Beagle, Schnauzer). Se ha postulado que el Bóxer y el Terrier de Boston poseen oncogenes que se transmiten a la descendencia, lo que, combinado con una deficiencia genética inmunológica, determinarían una mayor incidencia del mastocitoma en estas razas (Paz *et al.*, 2005).



Debido a que los mastocitomas son más prevalentes en las razas puras, al evaluar éstas, se intenta por medio del *gráfico 5*, ilustrar la distribución de dichos tumores según las razas, en las que queda implícito que en la raza Bóxer son más prevalentes 28% (8/38), seguida por la raza Labrador 17% (5/38), y el Dogo Argentino 10% (3/38).

Otra de las variables de suma importancia que fue analizada fue la distribución de casos según el sexo (*Gráfico 6*). Hemos observado que la mayoría de los mastocitomas se encontraron en hembras 58% (22/38), en tanto que los machos representaron el 42% (16/38). Esta observación ha sido coincidente con el reporte de otros autores en la que encontraron mayor número de casos en hembras que en machos (Simoes *et al.*, 1994). Otros autores indican que no hay predisposición por sexo en la ocurrencia del tumor de células cebadas (Lemarié *et al.*, 1995; Scott *et al.*, 1996; Vail, 1996).



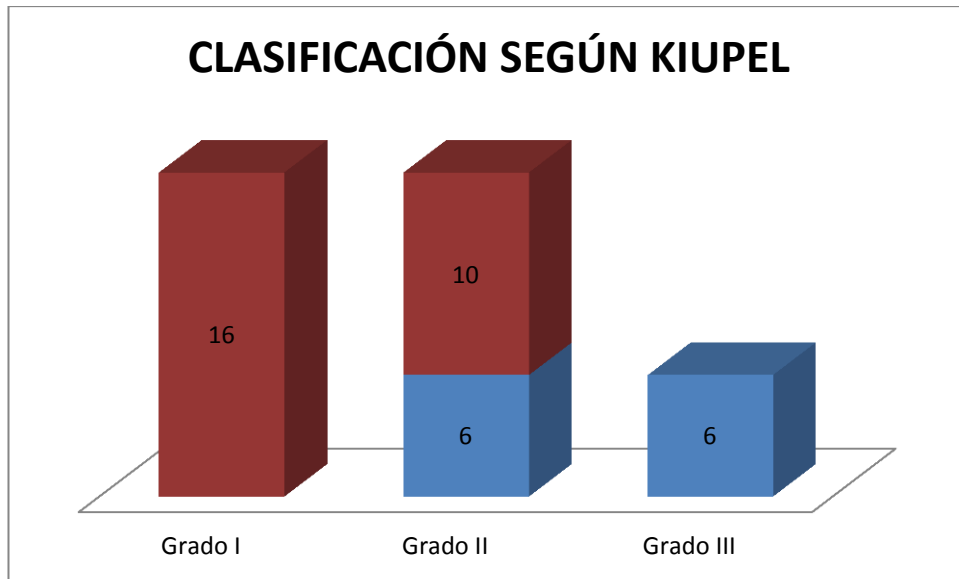
En el *gráfico 6*, se ilustra cómo en la casuística analizada en la ciudad de Río Cuarto, las hembras son quienes más padecen la enfermedad bajo estudio, 58% (22/38).

Luego de evaluar distintas variables, se procedió a reevaluar las muestras y clasificarlas según los parámetros establecidos por Kiupel, en los cuales se puede categorizar los casos en dos grados; Alto Grado Malignidad y Bajo Grado de Malignidad. Los mastocitomas de alto grado se caracterizan por contener cualquiera de los siguientes criterios:

- Al menos 7 figuras mitóticas en 10 campos de alta resolución (*Imagen 14*)
- Al menos 3 células multinucleadas en 10 campos de alta resolución (*Imagen 13*)
- Al menos 3 núcleos extraños en 10 campos de alta resolución y cariomegalia (*Imagen 14*)

Todos otros tumores se consideran de bajo grado. (*Imagen 15, 16, 17, 18, 19*)

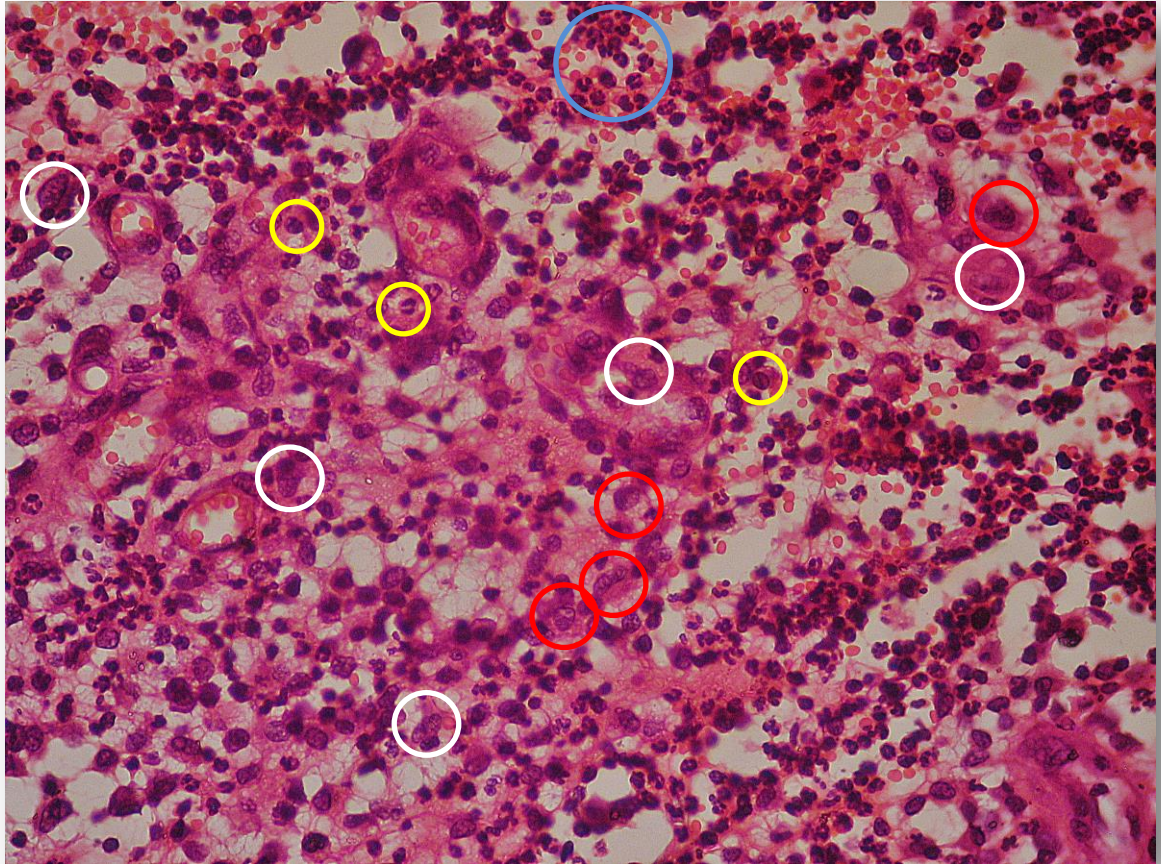
Las neoplasias que habían sido clasificadas como grado I según Patnaik, fueron clasificadas como Bajo Grado de Malignidad. En tanto que las neoplasias de grado III se clasificaron como Alto Grado de Malignidad. El énfasis se realizó en aquellos tumores que se consideran de grado II, y se obtuvo de los 16 casos; 6 (6/16) clasificados como Alto Grado de Malignidad, y 10 (10/16) como Bajo Grado de Malignidad. (*Gráfico 7*)



Como se puede analizar en el *Gráfico 7*, los mastocitomas de grado II según Patnaik, fueron reclasificados por los parámetros establecidos según Kiupel. En el total de los 16 casos, 6 (6/16) se correspondieron con Alto Grado de Malignidad, y 10 (10/16) en Bajo Grado de Malignidad.



Imagen 13, La imagen en 400x muestra una histopatología proveniente de una neoplasia en un canino de raza Dachshound, macho, de edad desconocida. La muestra fue clasificada según los parámetros de Patnaik como grado II. En la reclasificación por Kiupel, se la identificó como Alto Grado de Malignidad, ya que uno de los puntos establecidos en dicha clasificación es la presencia de al menos 3 células multinucleadas en 10 campos de alta resolución (*círculos negros*)



La Imagen 14, (400x) es una histopatología proveniente de un canino, macho, mestizo, de edad desconocida, que presentó lesión en piel interdigital. A la evaluación según Patnaik, se diagnosticó una neoplasia, mastocitoma de grado II. En el análisis según Kiupel, se encontraron diversos parámetros; al menos 3 núcleos extraños (o bizarros) en 10 campos de alta resolución (*círculos blancos*). Al menos 7 figuras mitóticas en 10 campos de alta resolución (*círculos amarillos*). También puede observarse un marcado pleomorfismo celular (*círculos rojos*), y un fuerte infiltrado de células inflamatorias de tipo PMN neutrófilos (*círculo celeste*). Debido a esto, se concluyó que la muestra es de Alto Grado de Malignidad.

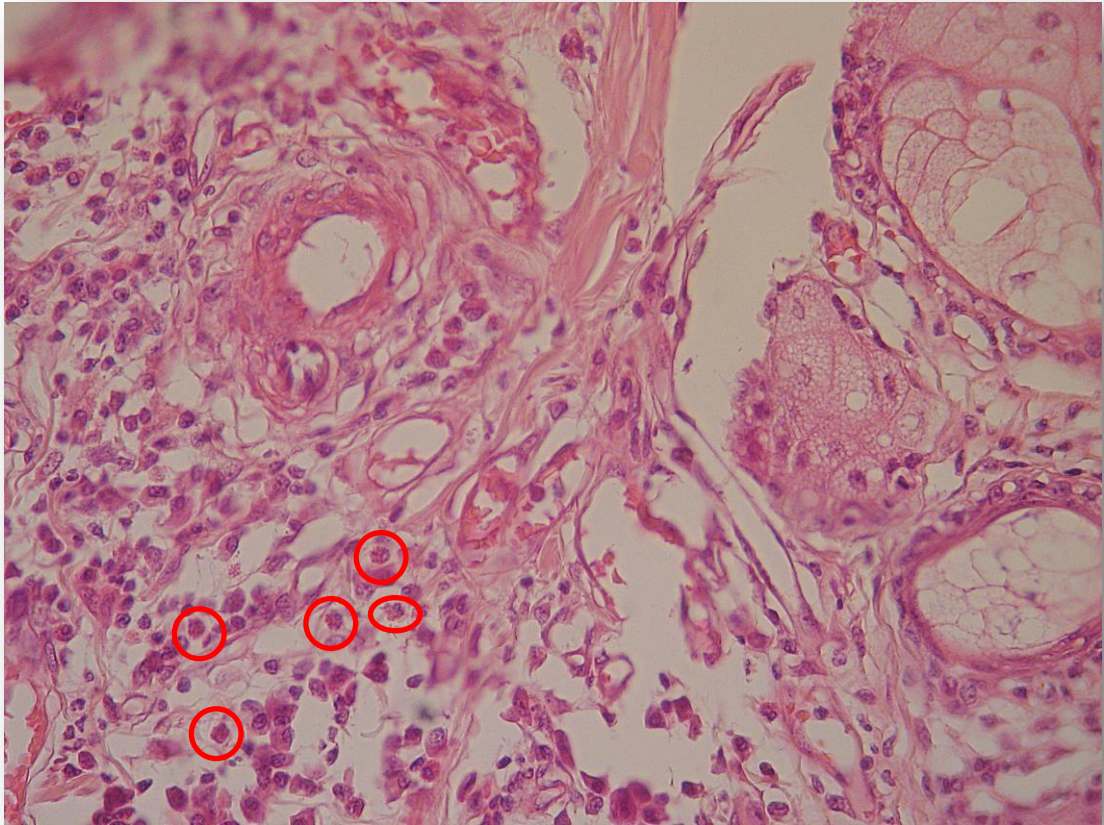


Imagen 15;(400x) La siguiente biopsia ilustra una neoplasia en un canino mestizo, hembra de 10 años, que se clasificó como mastocitoma de grado II. En el posterior análisis, no se encontraron los parámetros estipulados por Kiupel previamente mencionados, por lo cual se la considera como mastocitoma de Bajo Grado de Malignidad. Se puede observar además, la presencia de gran cantidad de células inflamatorias de tipo PMN eosinófilos (*círculos rojos*), lo que denota en gran medida una buena diferenciación tumoral, ya que los eosinófilos son atraídos quimiotácticamente por los mastocitos.

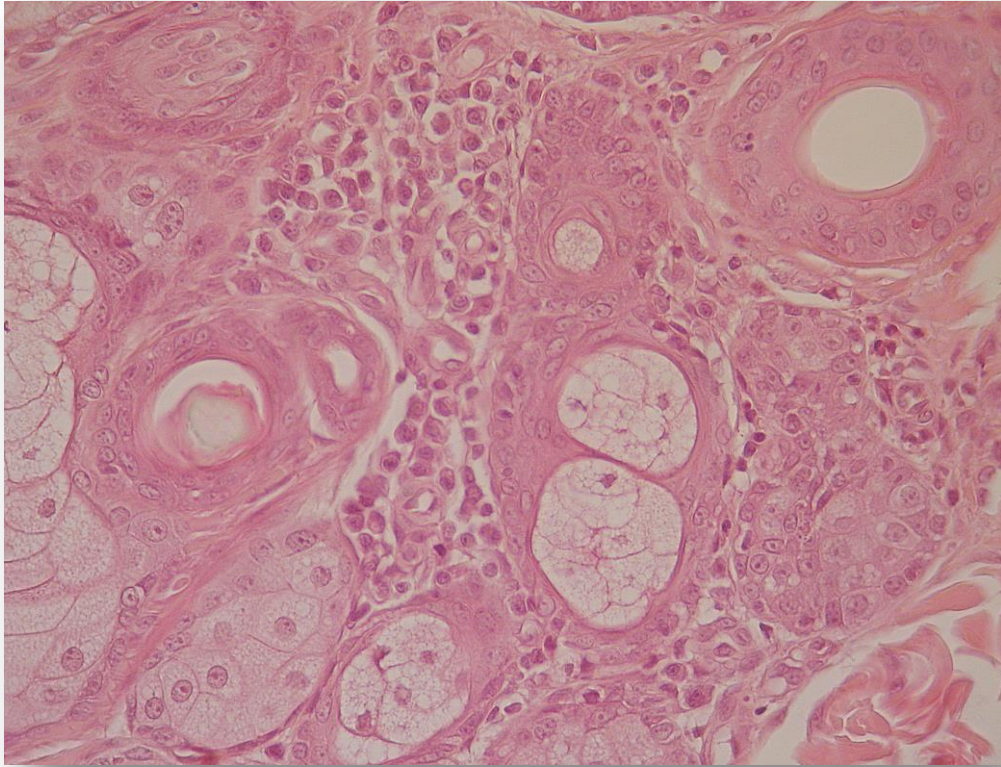


Imagen 16; (400x) Mastocitoma de grado II, en canino hembra de raza Bull Terrier, 1 1/5 años de edad. Lesión ubicada en el puente nasal. Según la clasificación de Kiupel se corresponde con un mastocitoma de Bajo Grado de Malignidad.

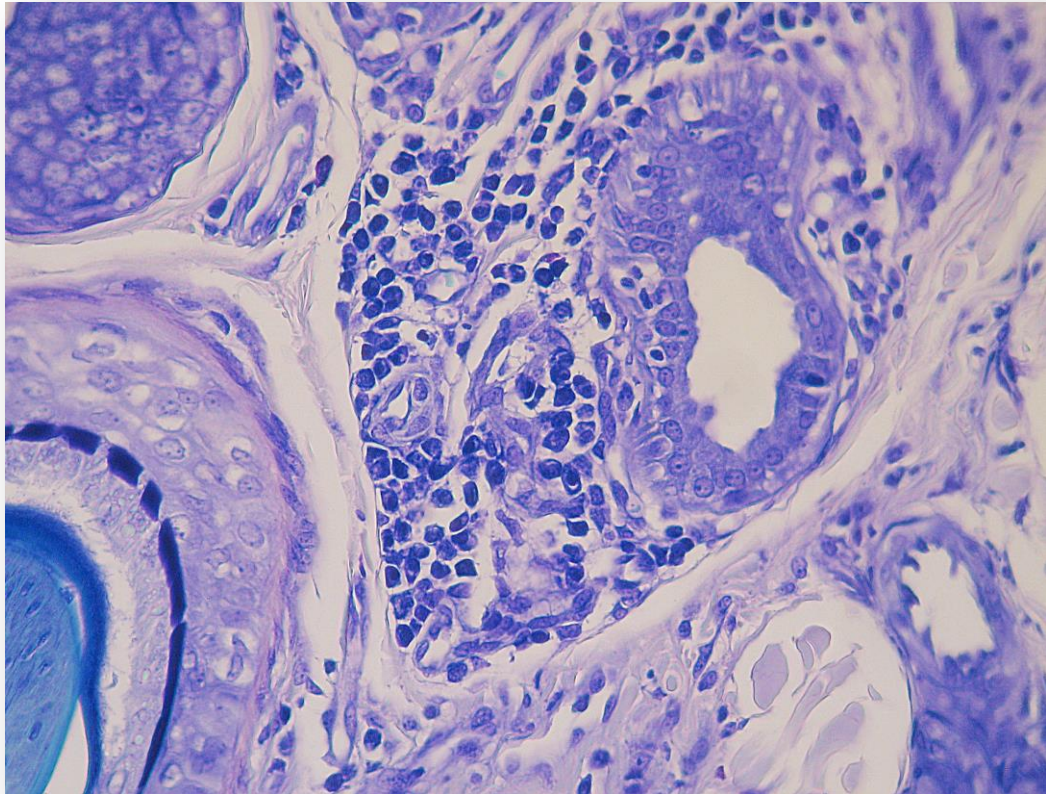


Imagen 17;(400x) Misma muestra que la anterior, con tinción diferencial Azul de Toluidina. En la cual se ponen en evidencia los gránulos presentes en las células cebadas. Bajo Grado de Malignidad.

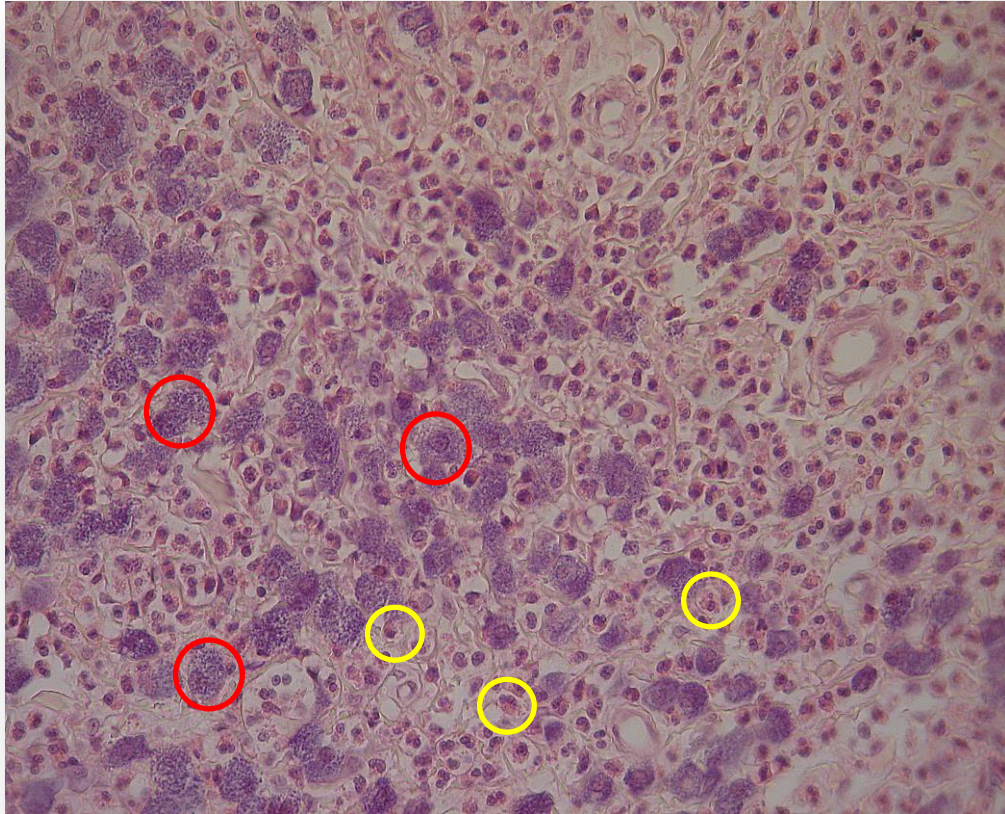


Imagen 18 (400x) En el estudio de la histopatología que se muestra, procedente de un canino de raza Bóxer, macho de 7 años de edad, con neoplasia ubicada en piel de escroto, se clasificó según Patnaik en mastocitoma de grado I. Nótese en la misma, la buena diferenciación de las células neoplásicas, en las cuales se evidencian claramente los gránulos citoplasmáticos (*círculos rojos*), la relación núcleo-citoplasma, ausencia de figuras mitóticas, y la presencia de PMN eosinófilos (*círculos amarillos*). Según Kiupel, se considera un mastocitoma de Bajo Grado de Malignidad. En la imagen inferior, se evidencia con mayor claridad la

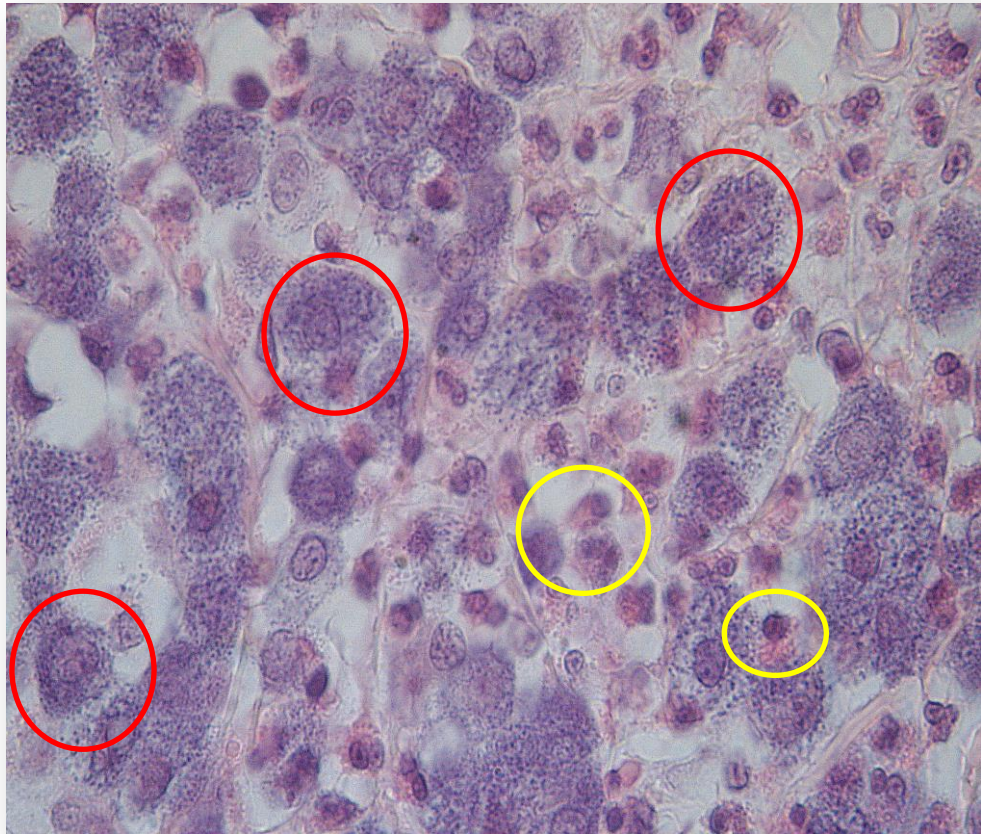


Imagen 19 (400x) Mismo estudio de histopatología que se muestra en la figura 18, procedente de un canino de raza Bóxer, macho de 7 años de edad, con neoplasia ubicada en piel de escroto, e clasificado según Patnaik en mastocitoma de grado I. Nuevamente se observa la buena diferenciación de las células neoplásicas, en las cuales se evidencian claramente los gránulos citoplasmáticos (*círculos rojos*), la relación núcleo-citoplasma, ausencia de figuras mitóticas, y la presencia de PMN eosinófilos (*círculos amarillos*). Según Kiupel, se considera un mastocitoma de Bajo Grado de Malignidad. En la imagen inferior, se evidencia con mayor claridad la presencia de los gránulos citoplasmáticos.

CONCLUSIONES

El mastocitoma cutáneo canino es una de las neoplasias más prevalentes dentro de los tumores de piel.

En nuestra región, las razas Bóxer, Labrador Retriever y Dogo Argentino, han sido de las más prevalentes en la presentación de dicha neoplasia.

Así mismo, también se ha demostrado que las hembras poseen mayor predisposición a padecer dicha enfermedad y el grupo etario comprendido entre 5 y 9 años son los más afectados.

Se ha visto en numerosos trabajos grandes discrepancias acerca de la clasificación de los mastocitomas, y creemos que tanto la clasificación de Patnaik y Kiupel pueden ser correctamente empleadas a la hora de clasificar y brindar un diagnóstico al clínico, en nuestra preferencia, la clasificación de Patnaik nos es más representativa en cuanto a factor pronóstico.

Si bien las clasificaciones histopatológicas son acordes, para predecir un buen panorama pronóstico, se deberían investigar nuevos métodos, como marcadores celulares más exactos.

BIBLIOGRAFÍA

ABADIE JJ, AMARDEILH MA, DELVERDIER ME (1999). Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *JAVMA* 15:1629-1634.

ABDEL-MAJID RM and MARSHALL JS. 2004. Prostaglandin E2 induces degranulation-independent production of vascular endothelial growth factor by human mast cells. *The Journal of Immunology*. **172**:1227–1236

ALBINI A, BRIGATI C, VENTURA A, LORUSSO G, PINTER M, MORINI M, & NOONAN D.M. (2009) Angiostatin anti- angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *J Transl Med*; 7:5-13

AMMENDOLA M, SACCO R, SAMMARCO G, DONATO G, MONTEMURRO S, RUGGIERI E, & GADALETA, C.D. (2014). Correlation between serum tryptase, mast cells positive to tryptase and microvascular density in colo-rectal cancer patients: possible biological-clinical significance. *PLoS One*. Jun 10;9(6):e99512. doi: 10.1371/journal.pone.0099512. eCollection 2014

AMORIM1 R.L., P. PINCZOWSKI, R. T. NETO, S. C. (2010). Rahal, Immunohistochemical evaluation of prostaglandin E2 and vascular endothelial growth factor in canine cutaneous mast cell tumours, [Vet Comp Oncol](#). Mar;8(1):23-7. doi: 10.1111/j.1476-5829.2009.00202.x

ARVELO F (2013) Micrometástasis: estrategias para su detección. *Invest Clínic*; 54:206-225

BAKER-GABB M, HUNT GB, FRANCE MP. (2003). Soft tissue sarcomas and mast cell tumours in dogs; clinical behavior and response to surgery. *Aust Vet J* 81:732-738.

BALKWILL F, (2006) TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *CancerMetastasis Rev*; 25:409-416

BANCHEREAU, J. y STEINMAN, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673): 245.

BECERRA, C.A.(2014). Estudio epidemiológico retrospectivo de neoplasias diagnosticadas por histopatología en caninos en una Clínica Veterinaria de Bogotá D.C. Tesis de Grado. Facultad de Ciencias Veterinaria. Universidad la Salle. Bogotá, Colombia. 70p.

BISWAS SK, MANTOVANI A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cáncer as a paradigm. *Nat Immunol*; 11:889-896

BLACKWOOD L, MURPHY S, BURACCO P, & ARGYLE. (2012). European consensus document on mast cell tumours in dogs and cats. *Vet Comp Oncol*. 10:e1–e29

BORREGAARD N, COWLAND JB (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*; 89:3503-3521

BOSTOCK DE, CROCKER J, HARRIS K, SMITH P. (1989). Nucleolar organizer regions as indicators of post-surgical prognosis in canine spontaneous mast cell tumours. *Br J Cancer* 59:915-918.

BOSTOCK, D.E. (1973). The prognosis following surgical removal of mastocytomas in dogs. *J Small Anim Pract* 14:27–40.

BRAUMULLER H, WIEDER T, BRENNER E, ASSMANN S, HAHN M, ALKHALED M, & RANTA F. (2013) T-helper-1-cell cytokines drive cancer in to senescence. *Nature*; 494:361-365

Brown DE, Thrall MA, Getzy DM, WEISER MG, & OGILVIE, GK. (1994). Cytology of canine malignant histiocytosis, *Vet Clin Pathol* 23:118–123.

BUNT SK, SINHA P, CLEMENTS VK, LEIPS J, OSTRAND-ROSENBERG S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*; 176:284-290

Camacho L. 2001. Fisiopatología Tumoral. **Curso de oncología en pequeñas especies**. Asociación de médicos veterinarios especialistas en pequeñas especies y los colegios de médicos veterinarios zootecnistas. D.F. México. P: 5-14.

CAYATE S. M., MCMANUS P. M. & MILLER W. H. (1995). Identification of cell mast in buffy coat preparations from dog with inflammatory skin diseases. *JAVMA*; 206: 325-326.

CONDEELIS J, POLLARD JW. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*; 124:263-266

CRAIG LE, JULIAN ME, FERRACONE JD. (2002). The diagnosis and prognosis of synovial tumors in dogs: 35 cases, *Vet Pathol* 39:66–73.

CRUZ-ARAMBULO R, WRIGLEY R, POWERS B. (2004). Sonographic features of histiocytic neoplasms in the canine abdomen, *Vet Radiol Ultrasound* 45:554–558.

DA COSTA, R. M. G., MATOS, E., REMA, A., LOPES, C., PIRES, M. A., & GÄRTNER, F. (2007). CD117 immunoexpression in canine mast cell tumours: correlations with pathological variables and proliferation markers. *BMC veterinary research*, 3(1), 19.

DARLAND DC, MASSINGHAM LJ, SMITH SR, PIEK E, SAINT-GENIEZ M, D'AMORE PA. (2003). Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation-dependent and is associated with endothelial survival. *Dev Biol*; 264: 275-288

DE NARDI, A. B., RODASKI, S., SOUSA, R. S., COSTA, T. A., MACEDO, T. R., RODIGHERI, S. M., & PIEKARZ, C. H. (2002). Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal do Paraná. *Archives of Veterinary Science*, 7(2).

DE SOUZA DA Jr , TOSO VD, CAMPOS MR, LARA VS, OLIVER C, JAMUR MC (2012). Expression of mast cell proteases correlates with mast cell maturation and angiogenesis during tumor progression. *PLoS One*; 7(7):e40790. doi: 10.1371/journal.pone.0040790. Epub 2012 Jul 18

DORE-DUFFY P, and CLEARY K (2011). Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*; 686, 49-68

DUMONT N, LIU B, DEFILIPPIS RA, CHANG H, RABBAN JT, KARNEZIS AN, & TLSTY TD. (2013). Breast fibroblasts modulate early dissemination, tumorigenesis, and metastasis through alteration of extracellular matrix characteristics. *Neoplasia*; 15:249-262

ELSTON LB, SUEIRO FA, CAVALCANTI JN, METZE K. (2009). The importance of the mitotic index as a prognostic factor for survival of canine cutaneous mast cell tumors: a validation study. *Vet Pathol* 46:362–365.

EREZ N, TRUITT M, OLSON P, ARRON ST, HANAHAN D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. *Cancer Cell*; 17:135-47

ESCRIBESE MM, CASAS M, CORBI AL. (2012). Influence of low oxygen tensions on macrophage polarization. *Immunobiology*; 217:1233-1240

FALCÓN B L, HASHIZUME H, KOUMOUTSAKOS P, CHOU J, BREADY JV, COXON A, & McDONALD. (2009). Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol*; 175: 2159-2170

FERRARA N, KERBEL RS.(2005). La angiogénesis como un objetivo terapéutico, *Nature* 438: 967–974.

FOLKMAN J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*; 285: 1182-1186

FOX, L. E. (1998). Mast cell tumors. *MORRISON, WB Cancer in Dogs and Cats: Medical and Surgical Management. Baltimore: Williams & Wilkins, 477-486.*

FRISCH, S. M. y FRANCIS, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. cell biol.* 124(4), 619-626.

FRISCH, S. M., & FRANCIS, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *The Journal of cell biology, 124(4)*, 619-626.

FUKUDA R, KELLY B & SEMENZA GL. (2003). Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Research*; 63:2330-2334

GABRILOVICH D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat RevImmunol*; 4:941-952

GASTEIGER G, HEMMERS S, FIRTH MA, LE FLOC'H A, HUSE M, SUN JC, & RUDENSKY A. (2013). IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *J Exp Med*; 210:1179-1187

GERBER HP & FERRARA N. (2003). The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *Journal of Molecular Medicine*; 81: 20-31

GILFILLAN AM, AUSTIN SJ, METCALFE DD. (2011). Mast Cell Biology: Introduction and Overview. *Adv Exp Med Biol.* 716:2–12

GOUMANS MJ., VALDIMARSDOTTIR G, ITOH S, ROSENDAHL A, SIDERAS P, TEN DIJKE, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J*; 21:1743-1753

GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*; 140:883-899

GROSS TL, IHRKE PJ, WALDER EJ, AFFOLTER VK. (2005). Mast cell tumors. In: Skin Diseases of the Dog and Cat: Clinical and Histopathologic Diagnosis, ed. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, and Affolter VK, 2nd ed., pp. 853–865. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.

GUNDERSON AJ , COUSSENS LM. (2013). B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Exp Cell Res*; 319:1644-1649

GUNDERSON, A. J., & COUSSENS, L. M. (2013). B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Experimental cell research*, 319(11), 1644-1649.

HAFEMAN S, LONDON C, ELMSLIE R, DOWN S. (2010). Evaluation of liposomal clodronate for treatment of malignant histiocytosis in dogs, *Cancer Immunol Immunother* 59:441–452.

HANAHAN, D. y WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5): 646-674.

HAYDEN DW, WATERS DJ, BURKE BA, & MANIVEL JC. (1993). Disseminated malignant histiocytosis in a golden retriever: clinicopathologic, ultrastructural, and immunohistochemical findings, *Vet Pathol* 30:256–264.

HELDIN CH, WESTERMARK B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*; 79:1283-1316

HOTTENDORF, G. H., & NIELSEN, S. W. (1969). Canine mastocytoma--a review of clinical aspects. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 154(8), 917-924.

HOTTENDORF, G.H. and NIELSEN, S.W. (1967). Pathologic survey of 300 extirpated canine mastocytomas. *Zentralbl Veterinarmed A* 14:272–281.

HOWARD, E. B., SAWA, T. R., NIELSEN, S. W., & KENYON, A. J. (1969). Mastocytoma and gastroduodenal ulceration: Gastric and duodenal ulcers in dogs with mastocytoma. *Pathologia veterinaria*, 6(2), 146-158.

IWATA, N., OCHIAI, K., KADOSAWA, T., TAKIGUCHI, M., & UMEMURA, T. (2000). Canine extracutaneous mast-cell tumours consisting of connective tissue mast cells. *Journal of comparative pathology*, 123(4), 306-310.

JANKOWSKI, M. K., OGILVIE, G. K., LANA, S. E., FETTMAN, M. J., HANSEN, R. A., POWERS, B. E., & WALTON, J. A. (2002). Matrix metalloproteinase activity in tumor, stromal tissue, and serum from cats with malignancies. *Journal of veterinary internal medicine*, 16(1), 105-108.

KALLURI R, ZEISBERG M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature reviews. Cancer*; 6:392-401

KAPLAN RN, RIBA R, ZACHAROULIS S, BRAMLEY A, VICENT L, COSTA C., ZHU Z. (2005). VEGFR-1 positive haemopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature*; 438: 820-827

KIPEL M., WEBSTER J.D., BAILEY K.L. (2011). Proposal of a 2-tier histologic grading system for canine cutaneous mast cell tumors to more accurately predict biological behavior. *Vet Pathol.*;48:147–155.

KONG N, FOTOUHI N, WOVKULICH PM y ROBERTS J. (2003). Cell cycle inhibitors for the treatment of cancer, *Drugs of the future* 28(9):881–896.

LANE, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358: 15-1.

LEIBMAN, N. F., LANA, S. E., HANSEN, R. A., POWERS, B. E., FETTMAN, M. J., WITHROW, S. J., & OGILVIE, G. K. (2000). Identification of matrix metalloproteinases in canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of veterinary internal medicine*, 14(6), 583-586.

LEMARIE R.J., LEMARIE S.L., HEDLUND C.S. (1995). Mast cell tumours: clinical management. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 17: 1085-1101.

- LIOTTA L.A., KOHN E.C. (2001). The microenvironment of the tumour-host interface, *Nature* 411(6835):375–379.
- LIU K., NUSSENZWEIG M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*; 234:45-54
- LIU X.H., KIRSCHENBAUM A., LU M., YAO S., DOSORETZ A., HOLLAND J.F. & LEVINE A.C. (2002). Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *The Journal of Biological Chemistry*; **277**: 50081–50086.
- LOMBARD, L. S., MOLONEY, J. B., & RICKARD, C. G. (1963). Transmissible canine mastocytoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 108(3), 1086-1105.
- LU H., GOODELL V., DISIS M.L. (2008). Humoral immunity directed against tumor-associated antigens as potential biomarkers for the early diagnosis of cancer. *J Proteome Res*; 7:1388-1394
- LUPULESCU A. (1996). Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*; **54**: 83–94.
- MACY, D. W. (1985). Canine mast cell tumors. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 15(4), 783-803.
- MAGLENNON G.A., MURPHY S., ADAMS V., MILLER J., SMITH K., BLUNDEN A., SCASE T.J. (2008). Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet Comp Oncol* 6:268–274.
- MARICHAL T., TSAI M., GALLI S.J. (2013). Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. *Cancer Immunol Res*; 1:269-279
- MARSH T., PIETRAS K., MCALLISTER S.S. (2013). Fibroblasts as architects of cancer pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1832:1070-1078
- MENDOZA M., KHANNA C. (2009). Revisiting the seed and soil in cancer metastasis, *Int J Biochem Cell Biol* 41(7):1452–1462.
- MEREDITH J. E., FAZELI, B. y SCHWARTZ, M. A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. biol.cell.* 4(9):953-961.

MEREDITH Jr, J. E., FAZELI, B., & SCHWARTZ, M. A. (1993). The extracellular matrix as a cell survival factor. *Molecular biology of the cell*, 4(9), 953-961.

MILLER W. H, SCOTT D.W, GRIFFIN C. E. (2002). Muller & Kirk s: *Dermatología en pequeños Animales*. 6ta edición, España. Ed: Intermedica.

MISDORP, W. (2004). Mast cells and canine mast cell tumours. A review. *Veterinary Quarterly*, 26(4), 156-169.

MIYOSHI, N., TOJO, E., OISHI, A., FUJIKI, M., MISUMI, K., SAKAMOTO, H., & YASUDA, N. (2002). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein (PGP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) in canine cutaneous mast cell tumors. *Journal of veterinary medical science*, 64(6), 531-533.

MOLLER HD, RALFKJAER U, (2011). Role of fibulin-5 in metastatic organ colonization. *Mol Cancer Res: MCR*; 9(5):553-63.

MOLLER HD, RALFKJAER U, CREMERS N, FRANKEL M, PEDERSEN RT, KLINGELHOFER J., & LUKANIDIN E., (2011). Role of fibulin-5 in metastatic organ colonization. *Molecular Cancer Research*; 9: 553-563.

MOORE P.F., AFFOLTER V., OLIVRY T., & SCHRENZEL M.D. (1998). The use of immunological reagents in defining the pathogenesis of canine skin disease involving proliferation of leukocytes. In Kwochka KW, Wilemse T, von Tschanner C, editors: *Advances in veterinary dermatology*, Oxford.

MORINI, M., BETTINI, G., PREZIOSI, R., & MANDRIOLI, L. (2004). C-kit gene product (CD117) immunoreactivity in canine and feline paraffin sections. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 52(5), 705-708.

MORRIS & DOBSON, 2002. *Small Animal Oncology*. Wiley-Blackwell Ed, Oxford, London.

MOSSER D.M., EDWARDS J.P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology*; 8:958-969

MOTZ G.T., COUKOS G. (2011). The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cáncer and other tales. *Nat Rev Immunol*; 11:702-711

MOULTON, J.E. (1990). *Tumors in Domestic Animals*, 3rd ed. University of California Press, (ed.), Berkeley.

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). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 228(1), 91-95.

MURDOCH C., MUTHANA M., COFFELT S.B., LEWIS C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*; 8:618-631

NAKAYAMA T, MUTSUGA N, YAO L AND TOSATO G. (2005). Prostaglandin E2 promotes degranulation independent release of MCP-1 from mast cells. *Journal of Leukocyte Biology*; 79:95–104.

NARANJO C., DUBIELZIG R., FRIEDRICHS K. (2007). Canine ocular histiocytic sarcoma, *Vet Ophthalmol* 10:179–185, 2007

NELSON D., GANSS R. (2006) Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J Leukoc Biol*; 80: 685-690

NEWLANDS C.E., HOUSTON D.M., VASCONCELOS D.Y. (1994). Hyperferritinemia associated with malignant histiocytosis in a dog, *J Am Vet Med Assoc* 205:849–851, 1994

NICO B., MANGIERI D., CRIVELLATO E., VACCA A., RIBATTI D. (2008). Mast cells contribute to vasculogenic mimicry in multiple myeloma. *Stem Cells Dev*; 17:19-22

NIELSEN, S.W. (1952). Clinical Aspects of Mastocytoma in Dogs. *Proc. Amer. Vet. Med. Ass. 89th Meeting* , 212-218.

NORN, S. (1965). Chemical Determination of Histamine in Tissues and Mast Cells. *Acta pharmacologica et toxicologica*, 22(2), 115-125.

O'KEEFE, D. A., COUTO, C. G., BURKE-SCHWARTZ, C., y JACOBS, R. M. (1987). Systemic mastocytosis in 16 dogs. *J Vet In Med*, 1(2): 75-80.

ORIMO A., GUPTA P.B., SGROI D.C., ARENZANA-SEISDEDOS F., DELAUNAY T., NAEEM R. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote

tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*; 121: 335-348

ORKIN, M., & SCHWARTZMAN, R. M. (1960). A Comparative Study of Canine and Human Dermatology: II. Cutaneous Tumors—Introduction and Discussion of Transmissible Reticulum-Cell Tumor. *AMA Archives of Dermatology*, 81(3), 347-358.

OSKARSSON T., ACHARYYA S., ZHANG X.H., VANHARANTA S., TAVAZOIE S.F., MORRIS P.G. (2011) Breast cancer cells produce tenascin C as a metastatic niche component to colonize the lungs. *Nature Medicine*; 17: 867-874

Paoloni, M., Davis, S., Lana, S., Withrow, S., Sangiorgi, L., Picci, P., & Khanna, C. (2009). Canine tumor cross-species genomics uncovers targets linked to osteosarcoma progression. *BMC genomics*, 10(1), 625.

PATNAIK A.K., EHLER W.J., MACEWEN E.G. (1984). Canine cutaneous mast cell tumor: morphologic grading and survival time in 83 dogs. *Vet Pathol* 21:469–474, 1984.

PATNAIK, A. K., MACEWEN, E. G., BLACK, A. P., & LUCKOW, S. (1982). Extracutaneous mast-cell tumor in the dog. *Veterinary pathology*, 19(6), 608-615.

PAZ N, FOGEL F, DENZOI L.(2005). Mastocitoma cutáneo: dos casos en una familia de perros Bóxer. Universidad del Centro Tandil, Argentina. Veterinarios en web [Internet]. Disponible en: <http://veterinariosenweb.com/revista/capitulo8/nota2-1.html>

PAZ N., FOGEL F., DENZOI L. (2005). Mastocitoma cutáneo: dos casos en una familia de perros Bóxer. Universidad del Centro Tandil, Argentina. En: <http://veterinariosenweb.com/revista/capitulo8/nota2-1.html>

PERANZONI E, ZILIO S, MARIGO I, DOLCETTI L, ZANOVELLO P, MANDRUZZATO S, & BRONTE V. (2010). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol*; 22:238-244

PILLAI S., MATTOO H., CARIAPPA A. (2011). B cells and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*; 23:721-731

POLLACK, M.J. FLANDERS, J.A y JOHNSON R.C. (1991). Disseminated malignant mastocytoma in a dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 27: 435–440.

POTENTA S., ZEISBERG E., KALLURI R. (2008). The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression. *Br J Cancer*; 99:1375-1379

PSAILA B., LYDEN D. (2009). The metastatic niche: adapting the foreign soil. *Nature Reviews Cancer*; 9: 285-293

PULLEY, L. T. and STANNARD, A. A. (1990): Tumors of the skin and soft tissues. In: Meuten, D. J. (ed.) *Tumors in Domestic Animals*. 3rd edition. University of California Press, Berkeley. pp. 31–33.

QIAN B.Z., POLLARD J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*; 141:39-51

RANIERI G., PATRUNO R., RUGGIERI E., MONTEMURRO S., VALERIO P. & RIBATTI D. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF) as a target of bevacizumab in cancer: from the biology to the clinic. *Current Medicinal Chemistry*; **13**: 1845–1857.

RAZA A., FRANKLIN M.J., & DUDEK A.Z. (2010). Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *American Journal of Hematology*; 85: 593-598

REBUZZI L., WILLMANN M., SONNECK K., GLEIXNER K.V., FLORIAN S., KONDO R., MAYERHOFER M., VALES A., GRUZE A., PICKL W.F., THALHAMMER J.G. & VALENT P. (2007). Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor Flt-1 and KDR in canine mastocytoma cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 115: 320-333

REDONDO, E., SCLEEF, N., ALCOBA A., BAGNIS, G., MAFFRAND, C. (2011). Histopathological diagnosis frequency of neoplasms in companion animals. *Biocell*, 35(3): A327.

RICKLIN, M. E., ROOSJE, P. y SUMMERFIELD A. (2010). Characterization of canine dendritic cells in healthy, atopic, and non-allergic inflamed skin. *J. clinic. immune*. 30(6): 845-854.

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.

ROSIN, A., MOORE, P. y DUBIELZIG R. (1986). Malignant histiocytosis in Bernese Mountain dogs. *J. A. Vet. Med. Assoc.* 188(9): 1041-1045.

ROTHWELL T.L.W., HOWLETT C.R., MIDDLETON D.J. (1987). Skin neoplasms of dogs in Sydney, *Aust Vet J* 64:161–164.

ROTHWELL, T. L. W., HOWLETT, C. R., MIDDLETON, D. J., GRIFFITHS, D. A., & DUFF, B. C. (1987). Skin neoplasms of dogs in Sydney. *Australian Veterinary Journal*, 64(6), 161-164.

RUDDON, R.W. (1995) *Cancer Biology*. Oxford University Press, NY.

SABATTINI S., SCARPA F., BERLATO D., BETTINI G. (2015). Histologic Grading of Canine Mast Cell Tumor: Is 2 Better Than 3? *Veterinary Pathology*, Vol. 52(1). 70-73. DOI: 10.1177/0300985814521638.

SABEH, F., SHIMIZU-HIROTA R., WEISS S.J. (2009). Protease-dependent versus -independent cancer cell invasion programs: threedimensional amoeboid movement revisited, *J Cell Biol* 185(1):11–19.

SCAPINI P., LAPINET-VERA J.A., GASPERINI S., CALZETTI F., BAZZONI F., CASSATELLA M.A. (2000). The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*; 177:195–203

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.

SCOTT R.W., CRIGHTON D., OLSON M.F. (2011). Modeling and imaging 3-dimensional collective cell invasion. *J Vis Exp* (58).

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. (1996). (Eds.). *Dermatologia de pequenos animais*. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros,. Cap.19. p.926-1054.

SHELLY, S. M. (2003). Cutaneous lesions. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 33(1), 1-46.

SHOUSHTARI A.N., SZMULEWITZ R.Z., RINKER-SCHAEFFER C.W. (2011). Metastasis suppressor genes in clinical practice: lost in translation? *Nat Rev Clin Oncol* 8(6):333–342.

SHREE T., OLSON O.C., ELIE B.T., KESTER J.C., GARFALL A.L., SIMPSON K. (2011). Macrophages and cathepsin proteases blunt chemotherapeutic response in breast cancer. *Genes & development*; 25:2465-2479

SIEMEISTER G, MARTINY-BARON G & MARME D. (1998). The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Reviews*; 17: 241-248

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.

SIMON K. y BERNARD S. (2012). Skin and subcutaneous tumors. *Veterinary Surgical Oncology*.

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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224(2), 236-240.

SKORUPSKI, K. A., RODRIGUEZ, C. O., KRICK, E. L., CLIFFORD, C. A., WARD, R., & KENT, M. S. (2009). Long-term survival in dogs with localized histiocytic sarcoma treated with CCNU as an adjuvant to local therapy. *Veterinary and comparative oncology*, 7(2), 139-144.

SNYDER, J. M., LIPITZ, L., SKORUPSKI, K. A., SHOFER, F. S., & VAN WINKLE, T. J. (2008). Secondary intracranial neoplasia in the dog: 177 cases (1986–2003). *Journal of veterinary internal medicine*, 22(1), 172-177.

STEEG P.S. (2004). Perspectives on classic article: metastasis suppressor genes, *J Natl Cancer Inst* 96(6):E4.

STRIETER R.M., BURDICK M.D., GOMPERS B.N., BELPERIO J.A., KEANE M.P. (2005) CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*; 16:593-609

SUNDBERG, C., KOWANETZ, M., BROWN, L.F., DETMAR, M., DVORAK, H.F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest*; 82:387-401

SZUKIEWICZ D, GUJSKI M, MASLINSKA D, SZEWCZYK G, BACHANEK M AND MASLINSKI S. (2005). Mast cell-derived VEGF and VEGF receptor type 1, 2, and 3 expression in human term trophoblast culture – influence of hypoxia. *Inflammation Research*;1: 82–83.

TAKAHASHI, T., KADOSAWA, T., NAGASE, M., MOCHIZUKI, M., MATSUNAGA, S., NISHIMURA, R., & SASAKI, N. (1997). Inhibitory effects of glucocorticoids on proliferation of canine mast cell tumor. *Journal of veterinary medical science*, 59(11), 995-1001.

TAMS, T. R., & MACY, D. W. (1981). Canine mast cell tumors. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 3(10), 869-78.

TAN, W., ZHANG, W., STRASNER, A., GRIVENNIKOV, S., CHENG, J. Q., HOFFMAN, R. M., & KARIN, M. (2011). Tumour-infiltrating regulatory T cells stimulate mammary cancer metastasis through RANKL–RANK signalling. *Nature*, 470(7335), 548.

TELLADO M., (2016). Mastocitomas Caninos: cuando la cirugía no alcanza. <http://vetoncologia.com/wp-content/uploads/2016/10/VetOncologia-Mastocitoma-Canino-Cuando-la-cirugia-no-alcanza.pdf>

THOMPSON JJ, PEARL DL, YAGER JA, BEST SJ, COOMBER BL, FOSTER RA (2011). Canine subcutaneous mast cell tumor: characterization and prognostic indices. *Vet Pathol* 48:156–168, 2011.

UNO Y, MOMOI Y, WATARI T.(1993). Malignant histiocytosis with multiple skin lesions in a dog, *J Vet Med Sci* 55:1059–1061.

UNO, Y., MOMOI, Y., WATARI, T., GOITSUKA, R., TSUJIMOTO, H., SHIMADA, T. y HASEGAWA, A. (1993). Malignant histiocytosis with multiple skin lesions in a dog. *J. Vet. Med. Sci.* 55(6): 1059-1061.

URB M., SHEPPARD D.C. (2012). The Role of Mast Cells in the Defence against Pathogens.;8(4):2–4

VAIL DM: 1996, Mast cell tumors. In: Small animal clinical oncology, ed. Withrow SJ, MacEwen EG, 2nd ed., pp. 192–210. WB Saunders, Philadelphia, PA.

VAIL, D.M. (1996). Mast cell tumors. In: WITHROW, S.J.; MACEWEN, E.G. (Eds.). *Small animal clinical oncology*. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders,. 589p. Cap.16, p.192-210.

VAN PELT, D. R., FOWLER, J. D., & LEIGHTON, F. A. (1986). Multiple cutaneous mast cell tumors in a dog: a case report and brief review. *The Canadian Veterinary Journal*, 27(7), 259.

VERNAU K.M., HIGGINS R.J., BOLLEN A.W. (2001). Primary canine and feline nervous system tumors: intraoperative diagnosis using the smear technique, *Vet Pathol* 38:47–57.

WEBSTER J.D., YUZBASIYAN-GURKAN V., MILLER R.A., KANEENE J.B., KIUPEL M. (2007). Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol* 44:298–308.

WEISS D.J. (2002). Flow cytometric evaluation of hemophagocytic disorders in canine, *Vet Clin Pathol* 31:36–41.

WEISS L. (1988). Ed. *Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology*. 6th ed. Baltimore: Urban & Schwarzenberg.

WEISS, E. (1965). Intranucleäre und intrazytoplasmatische Glykogenablagerungen in Mastzellentumoren des Hundes. *Pathologia veterinaria*, 2(5), 514-519.

WELLE MM, BLEY CR, HOWARD J AND RUFENACHT S (2008). Canine mast cell tumours: a review of the pathogenesis, clinical features, pathology and treatment. *Veterinary Dermatology*; **19**:321–339

WELLER CL, COLLINGTON SJ, WILLIAMS T, LAMB JR. (2011). Mast cells in health and disease; 484:473–84

WITHROW AND MACEWEN'S (2013). *Small Animal Clinical Oncology*. 5th edition

WONG CC, GILKES DM, ZHANG H, CHEN J, WEI H, CHATURVEDI P. (2011) Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 108: 16369-16374

WU, X., BAYLE, J. H., OLSON, D. y LEVINE, A. J. (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development*. 7(7a): 1126-1132.

YAN HH, PICKUP M, PANG Y, GORSKA AE, LI Z, CHYTIL A, (2010). Gr-1+ CD11b+ myeloid cells tip the balance of immune protection to tumor promotion in the premetastatic lung. *Cancer Research*; 70: 6139-6149

YU H, PARDOLL D, JOVE R (2009). STATs in cáncer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*; 9:798-809

ZABA LC, KRUEGER JG. (2009). Resident and inflammatory dendritic cells in human skin, *J Invest Dermatol* 129:302–308.