

01672
1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

HISTOGENESIS DE LOS TUMORES MIXTOS DE LA GLANDULA MAMARIA CANINA

FALLA DE ORIGEN

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS:
PATOLOGIA

PRESENTADA POR

MVZ. ENRIQUE MARTIN ABURTO FERNANDEZ

DIRECTORES DE TESIS:
DRA. LAURA CHAVEZ MACIAS
MVZ. NURIA DE BUEN DE ARGÜERO
MVZ. FRANCISCO TRIGO TAVERA
DR. JESUS REYNAGA OBREGON



MEXICO, D. F.

1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Con amor a mi novia y futura esposa Paty, quien me da cariño, entusiasmo y estabilidad.

A mis padres Enrique y Guadalupe por mi formación como persona.

A mis hermanos Aurora, Carmen y Ricardo por su ejemplo y unión.

A mis sobrinos Fernando y Monserrat.

A mis futuros suegros Agustín y Margarita por su paciencia y consejos académicos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nuria de Buen de Argüero por su impulso, estímulo y ayuda incondicional en mi formación como patólogo.

A la Dra. Laura Chávez por sus ideas y orientación importantes para el desarrollo de esta Tesis.

A los Dres. Francisco Trigo y Jesús Reynaga por su conducción e influencia positiva durante mis estudios de maestría.

Al Dr. Pepe Jessurun del Departamento de Patología del Hospital Universitario de Minnesota por hacer posible la realización de un excelente trabajo de inmunohistoquímica, fundamental para llevar a cabo el presente estudio.

A Lucha por llevar a cabo el trabajo Técnico de Microscopía electrónica con calidad y en poco tiempo.

A mis amigos y "Maestros" del Departamento de Patología de la FMVZ y del Hospital General de México, S.S.

Y como siempre a Paty quien me inspira y hace posible la buena presentación de mis trabajos.

Es importante constatar que la Técnica en Microscopía Electrónica **María de la Luz Rosales Montaña** llevó a cabo las preparaciones correspondientes a los cortes semifinos y finos necesarios para la observación y caracterización ultraestructural de este trabajo. Asimismo, elaboró el material fotográfico correspondiente y participó en su interpretación.

Por otro lado, las preparaciones de inmunoperoxidasa fueron llevadas a cabo en el laboratorio de Patología Quirúrgica del Hospital Universitario de Minnesota (Minneapolis, Minnesota), el cual aportó personal profesional y material necesario para su realización.

INDICE

	Página
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCION.....	3
MATERIAL Y METODOS.....	7
RESULTADOS.....	11
DISCUSION.....	17
LITERATURA CITADA.....	22
CUADROS.....	26
FIGURAS.....	28

RESUMEN

MVZ Aburto Fernández Enrique Martín. Histogénesis de los Tumores Mixtos de glándula mamaria canina. (Bajo la dirección de: Dra. Laura Chávez Macías, MVZ. Nuria de Buen de Argüero, MVZ Francisco Trigo Tavera y Dr. Jesús Reynaga Obregón).

El origen de los distintos componentes mesenquimatosos que caracterizan a los tumores mixtos de la glándula mamaria canina, han sido una controversia desde que fueron descritos por primera vez y la mayoría de los autores han encontrado por diferentes métodos, evidencias importantes que señalan a las células mioepiteliales como responsables. En el presente trabajo se estudiaron 15 tumores mixtos caninos por medio de la técnica del complejo avidina-biotina-peroxidasa, utilizando 7 marcadores (citoqueratinas, antígeno de membrana epitelial, antígeno carcinoembrionario, actina músculo específica, vimentina, proteína S-100 y desmina) comerciales para humanos, previa determinación de su reacción en tejidos controles de caninos; para correlacionar la expresión de dichos antígenos con los cambios ultraestructurales que se presentan en los componentes tisulares en transición. La mayoría de los anticuerpos resultaron confiables en tejidos caninos excepto proteína S-100. citoqueratina, actina músculo específica y vimentina se expresaron de forma notable en elementos epiteliales, mioepiteliales y mesenquimatosos respectivamente. Ultraestructuralmente se identificaron 6 tipos celulares principales de los cuales, las denominadas células de transición (filamentosas, estelares y condroides) conservaban características específicas de células mioepiteliales como filamentos de actina (5 a 8 nm), desmosomas y cuerpos densos. Dichos hallazgos por microscopía electrónica aunados a la expresión de antígenos de membrana y proteínas estructurales, manifiesta por inmunoperoxidasa, señalan a las células mioepiteliales o sus precursoras, como responsables de la formación del componente mesenquimatoso heterólogo característico de estos tumores. Se considera también la posibilidad de que el componente epitelial, se origine de células con capacidad de tener diferenciación divergente epi-mioepitelial como aparentemente ocurre en los adenomas pleomorfos de la glándula mamaria y salival del humano.

SUMMARY

The origin of the different mesenchymal components that characterizes the canine mixed mammary tumours has been a controversy since they were first discovered. Most of the authors have found through different methods, important evidences that point out the myoepithelial cells as responsables onces. In the present study, 15 canine mixed mammary tumours were studied using the avidin-biotin-peroxidase complex method with the 7 primary antibodies citokeratine, epithelial membrane antigen, carcinoembrionic antigen, muscle-specific actin, vimentin, s-100 protein and desmin. These are commercialy produced substances and were previously determinated regarding its reaction on control tissues to correlate expression of these antigens with the ultrastructural changes that result in the transition of the antibodies turned out to be reliable in canine tissue except in s-100 protein. Cytokeratin, muscle-specific actin and vimentin expressed themselves remarkably on epithelial, myoepithelial and mesenchymal elements respectively. Ultrastructurally, 6 main cellular types were identified and characterized from which the dominated transitional cells (filament, stellate and chondroid cells) kept characteristic and were specific of myoepithelial cell origin as actin filaments (5 to 8nm thick), desmosomes and dense bodies. These electron microscopic findings, together with the expression of the membrane and structural proteins manifested by immunoperoxidase, pointed out the myoepithelial cell origin or their precursors as responsible for the formation of the heterologous mesenchymal component typical of these tumors. The possibility that the epithelial component is originated from cells capable to have divergent epi-myoepithelial differentiation, as it apparently occurs in the pleomorphic adenomas of the human mammary and salivary gland, is also considered.

INTRODUCCION

Los tumores de glándula mamaria, ocupan el segundo lugar en frecuencia después de los tumores de piel en los perros de ambos sexos ⁽³⁸⁾, y son en la perra los más comunes, en la cual representan del 25 al 30% de todas las neoplasias ^(7,13).

Aproximadamente el 65% del total de tumores mamarios son tumores mixtos benignos y el 25% son carcinomas ^(11,32,34), el resto son adenomas, hiperplasias, tumores mixtos malignos y mioepiteliomas ⁽³⁰⁾. Los tumores mixtos reciben esta denominación debido a que están constituidos por diversos componentes tisulares como: epitelio glandular, tejido mixoide, cartilago y hueso ^(29,30).

La frecuencia de tumores mixtos mamarios en el perro comienza a ser alta a partir de los 6 años de edad, de tal manera que el riesgo de presentación aumenta con la edad y es mucho mayor en las perras viejas ^(13,16). Los tumores mixtos benignos a diferencia de los carcinomas, comienzan a formarse de uno a dos años antes ⁽³⁰⁾.

Se sabe también que la frecuencia es mucho mayor en algunas razas de cacería como el Pointer, Labrador, Setter inglés y Dachshund, así como, Poodle y Boston Terrier ^(11,15,26,29).

En cuanto a la etiología existe evidencia de que la influencia hormonal juega un papel importante en el desarrollo de los tumores mamarios. Se ha determinado que las neoplasias de glándula mamaria de la perra (tumores mixtos, carcinomas y sarcomas) presentan un mayor número de receptores para estrógenos y progesterona en las células que proliferan, en relación a la glándula mamaria normal ⁽⁹⁾. También se ha observado que el riesgo de presentación puede ser cuatro veces mayor en perras enteras que en perras ovariectomizadas, y es casi nulo en perras castradas antes del primer ciclo estral ^(13,15,16,31,31,47). Además, las neoplasias de glándula mamaria ocurren casi exclusivamente en hembras y ocasionalmente en machos, en los cuales la mayoría de las veces están asociados a tumores testiculares productores de estrógenos, como son los de células de Sertoli ⁽³⁰⁾.

En el caso de los tumores mixtos se ha pensado que los traumatismos seguidos de necrosis, hemorragia e inflamación, constituyen una serie de factores importantes para la formación de cartilago y hueso que los caracteriza, ya que se sabe que cualquier tumor mamario, incluyendo a los mixtos, aparece con mucha más frecuencia en las glándulas inguinales, que son las que más crecen durante la lactación y se hacen más pëndulas y vulnerables a traumatismos. Por otro lado, los tejidos conectivo y adiposo, cuyas funciones principales son dar sostén y proteger al órgano, son escasos en la glándula mamaria canina, a diferencia de la mujer, en la cual abunda el último⁽¹⁾.

El origen del tejido mixoide, cartilaginoso y óseo en estos tumores, ha sido una controversia desde que fueron descritos por primera vez. Se ha pensado que estos tejidos son el resultado de la metaplasia de tejido conectivo del estroma (3,7,14,17,20,31,36,46), del epitelio (1,22,25,27,34) o de las células mioepiteliales que rodean a los alveolos y conductos mamarios (6,10,17,18,29,37,39,40,43,45).

Pulley⁽⁴¹⁾, demostró la presencia de células mioepiteliales en los componentes adenomatoso, mixoide y cartilaginoso en un estudio de 30 tumores mixtos por medio de microscopía electrónica, histoquímica y actividad de fosfatasa alcalina. Sasadaira⁽⁴⁴⁾, determinó la presencia de células mioepiteliales neoplásicas alrededor de conductos atípicos y tejido mixomatoso utilizando microscopía electrónica en este tipo de tumores. Asimismo, Schlotke y Sandersleben, paralelamente demostraron la presencia de estas células, identificándolas como el principal constituyente en los tumores mixtos de la perra, al utilizar técnicas de histoquímica enzimática, microscopía electrónica e inmunofluorescencia para miosina de músculo liso. Tateyama y Cotchin⁽⁴⁹⁾ apoyaron la misma observación, mediante reacciones de fosfatasa alcalina observadas por microscopía de luz y electrónica. Bomhard y Cols⁽⁶⁾ basados en estudios de microscopía óptica y electrónica, informaron que el tejido óseo presente en estos tumores se desarrolla por osificación endocondral del cartilago previamente formado y que no existe evidencia en cuanto a que las células mioepiteliales neoplásicas sean las responsables de la formación de osteoide o hueso. En 1978, Tateyama y Cotchin⁽⁵⁰⁾ sugirieron por medio de estudios de ultraestructura, que las células filamentosas transicionales que se observan en las áreas adenomatosas de los tumores mixtos, y que son las que aparentemente dan lugar al tejido mixoide y cartilaginoso, se derivan de las células mioepiteliales. Tateyama y Cols⁽⁵¹⁾, con técnicas de histoquímica, sugirieron que en éste

tipo de neoplasias la matriz mucoide se transforma en matriz condroide, tal como ocurre durante la maduración del cartilago hialino normal. Karelina y Golubeva⁽²⁴⁾, identificaron a las células mioepiteliales como un componente celular importante en un estudio en donde se utilizó el método indirecto de Coons, para el cual se utilizó suero mono-específico para miosina de músculo liso. En este mismo estudio se observó que la intensidad de la fluorescencia, es decir, el grado de positividad, disminuyó a medida que las células neoplásicas infiltraban al estroma, o crecían hacia la luz de los conductos. En otro trabajo realizado por Kaldrymidou y Cols⁽²³⁾ por medio de microscopía electrónica, se describen tres diferentes áreas, así como tres estadios metaplásicos en tumores mixtos mamarios que, a consideración de los autores, constituyen los principales niveles de evolución en el desarrollo de este tipo de neoplasias, además se identifican en una de las áreas descritas, algunas estructuras con base en las cuales, los autores las designan como zonas de verdadero cartilago hialino. Finalmente, Arai y Cols⁽²⁾, demostraron la presencia de colágena de los tipos II y XI, bioquímicamente y por técnicas de inmunohistoquímica, en la matriz de cartilago metaplásico de estos tumores. Estos tipos de colágena constituyen parte de los principales componentes proteicos del cartilago hialino normal; en el mismo estudio se demostró la presencia de marcadores para células mioepiteliales (anticuerpos de conejo vs. queratina y actina) por inmunoperoxidasa en las células neoplásicas que proliferaron en torno a las áreas de cartilago metaplásico, y que al parecer fueron las responsables de la síntesis de colágena antes mencionada. Wargotz y Norris⁽⁵⁴⁾ mediante microscopía electrónica e inmunohistoquímica llegan a la conclusión de que en el carcinoma metaplásico, variedad productor de matriz, de la glándula mamaria de la mujer, el principal constituyente celular responsable de la síntesis de matriz mixoide, cartilaginosa y ósea, tiene características mioepiteliales. Esta neoplasia podría ser considerada como la contraparte humana de los llamados tumores mixtos malignos de la glándula mamaria canina (21,35,48,54).

Actualmente en patología humana es común el uso de técnicas de inmunoperoxidasa cuyo principio es demostrar la existencia de antígenos estructurales presentes en un tejido determinado (4,33,53). En el caso de las lesiones neoplásicas, es de gran ayuda para identificar el origen tisular de aquellos tumores indiferenciados, su variedad antigénica o funcional, así como, para clasificar aquellas neoplasias cuyas células alteradas muestran desdiferenciación y diferenciación hacia otros componentes distintos como es el caso de los adenomas pleomorfos y carcinomas metaplásicos de glándula mamaria, entre otros

(12,33,53,54). Los marcadores celulares que con frecuencia se han utilizado para el estudio de las lesiones antes mencionadas son citoqueratinas (CK), antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno de membrana epitelial (EMA), actina músculo-específica (MSA), proteína S-100 (PS-100), vimentina (VIM) y desmina (DESM) (12,28,35,54). Los tres primeros marcan principalmente antígenos epiteliales, siendo las CK una familia heterogénea de proteínas que varían en peso molecular y cuya expresión puede ser diferente en epitelios y mesotelios normales, así como, neoplásicos. El CEA es más específico de epitelios glandulares y más abundante en superficies lumbales. El EMA es una glicoproteína aislada de la membrana de glóbulos de grasa en la leche y por lo general es un complemento del anterior. Actina es una proteína contractil presente en las células de músculo liso y estriado, pericitos y células mioepiteliales de glándula mamaria, salival y sudorípara. La PS-100 está presente en tejido nervioso central y periférico, células de Langerhans y melanocitos de la piel, células reticulares interdigitantes, condrocitos y otros elementos como el mioepitelio de la glándula mamaria y salival. Vimentina es un filamento intermedio no específico que puede estar presente en una gran variedad de tejidos normales y neoplásicos principalmente de tipo mesenquimatoso. Esta última puede coexpresarse junto con otros filamentos intermedios como desmina, presentes en músculo liso, esquelético y cardíaco, cuya demostración establece la naturaleza miógena de cualquier neoplasia (4,33,53).

De lo anterior se desprende que existe evidencia importante, en favor de la teoría de que las células mioepiteliales son el principal componente celular que prolifera y se transforma para dar lugar al componente mesenquimatoso heterólogo, típico de los tumores mixtos de glándula mamaria canina.

El objetivo del presente estudio fue demostrar la expresión de proteínas estructurales y antígenos de membrana, que se pueden poner de manifiesto en los distintos componentes tisulares del tumor mixto de glándula mamaria canina por medio de técnicas de inmunoperoxidasa, con el objeto de establecer continuidad con los últimos estudios citados y correlacionarlos con los hallazgos ultraestructurales.

MATERIAL Y METODOS

Para el presente trabajo se seleccionaron 15 biopsias de tumores mixtos típicos de glándula mamaria canina, obtenidos del archivo de la sección de patología quirúrgica del departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la UNAM a partir de la revisión de 180 casos diagnosticados como tal, desde 1984 hasta 1991. La selección se realizó con base en la presencia de células que proliferan a partir de conductos y lóbulos mamaríos, los cuales, aparentemente reflejan diversos grados de desdiferenciación y diferenciación hacia tejidos mesenquimatosos.

El número de casos seleccionados es limitado debido a que el costo del material para llevar a cabo el estudio de microscopía electrónica e inmunohistoquímica es muy elevado sobre todo si se toma en cuenta que en la última, se utilizaron toda una serie de marcadores celulares y sus correspondientes testigos negativos y positivos para cada caso, de tal manera que éste incrementa considerablemente la cantidad de material por utilizar, la información para analizar y el tiempo para llevar a cabo un trabajo que debe ser concluido en un lapso preestablecido.

HISTOPATOLOGIA

Los tejidos para la revisión antes mencionados, fueron fijados con formalina amortiguada (pH 7.4) al 10%, incluidos en parafina y bloqueados, cortados a 4µm de espesor y teñidos con hematoxilina y eosina (H y E), para su observación por microscopía de luz.

INMUNOHISTOQUIMICA

Simultáneamente se procedió a evaluar si existía inmunorreactividad similar entre los marcadores celulares utilizados en tejidos humanos y los correspondientes tejidos caninos que sirvieron como testigos. De tal manera que se utilizaron anticuerpos comerciales contra CK, CEA, EMA, PS-100, VIM, MSA y DESM para ser incubados con cortes histológicos de: glándula salival, glándula mamaria, cartilago hialino, músculo esquelético y hueso normales; además de epitelio neoplásico (carcinoma epidermoide), y hueso con cartilago neoplásico (sarcoma osteogénico) de canideos. Asimismo se evaluó

la reactividad de dichos marcadores en los diferentes componentes del tejido mamario residual en cada caso (controles internos).

Por otro lado, se utilizó un control negativo para cada tejido y un control positivo para cada anticuerpo. El primero consistió en sustituir al primer anticuerpo por líquido ascítico normal de ratón, con el objeto de determinar indirectamente, la especificidad de dichos anticuerpos y descartar la posibilidad de reacciones positivas inespecíficas por parte del tejido o de una técnica defectuosa. El control positivo consistió en someter a cada anticuerpo con un tejido humano de reactividad conocida, para lo cual se utilizaron cortes histológicos de un melanoma para PS-100 y VIM, un rhabdiosarcoma para MSA y DESM, un carcinoma de colon para CEA y un carcinoma de células renales para EMA y CK.

Se utilizó la técnica del complejo avidina-biotina (ABC) de acuerdo con los siguientes pasos. Los cortes se desparafinaron con calor en una estufa a 60°C durante 24 horas y se terminaron de desparafinar en xilol para eliminar todos los restos de parafina. Se rehidrataron y se colocaron en un vaso de Koplín con peróxido de hidrógeno al 3% y metanol absoluto en una solución 1:4. Se incubaron en una cámara húmeda con el primer anticuerpo durante 24 horas a 4°C. Se lavaron en solución buffer de fosfato salino al 0.05M y se incubaron con el puente inmunológico biotilnado durante 30 minutos. Posteriormente se incubaron otros 30 minutos con avidina-biotina conjugada a peroxidasa. Por último se revelaron con cromógenos (diaminobencidina 25mg en 100ml, de buffer de fosfato salino y 0.6ml de agua oxigenada al 3%) y se contrastaron los núcleos con hematoxilina de Harris ^(19,42,53). Las laminillas se montaron con resina sintética, se etiquetaron con el número de estudio correspondiente y el nombre del primer anticuerpo utilizado para ser observadas en un microscopio de luz.

Una vez evaluados los testigos, se procedió a realizar la técnica de ABC con los mismos marcadores en cortes de 3 ó 4µm de grosor, a partir de los tumores mixtos seleccionados con la finalidad de establecer el grado de intensidad en las reacciones así como, el patrón de inmunoreactividad celular. Dicha evaluación fue realizada por observación doble independiente, para el grado de intensidad se interpretó como **fuertemente positivo** cuando las células presentaban un citoplasma de color café obscuro, **débilmente positivo** cuando las células presentaban citoplasma de color café

claro, dudoso cuando las células tenían citoplasma de color café claro pero en forma irregular y poco definida, es decir, cuando no se podía diferenciar entre débilmente positivo y una reacción negativa caracterizada por la ausencia de este pigmento. El patrón de inmunorreactividad fue denominado como difuso cuando la reacción dentro de un área era positiva o dudosa en una extensión de más del 30%, fue intermedio cuando la reacción se extendía entre un 10 y 30% y focal cuando la reacción estaba presente en uno o varios focos aislados dentro del área en observación.

Para poder llevar a cabo la correlación de los resultados por inmunoperoxidasa con los hallazgos ultraestructurales, cada tumor se dividió en 4 áreas principales que son: la adenomatosa, en la cual predominaba la proliferación de conductos y papilas revestidas por células epiteliales glandulares rodeadas y sostenidas por un estroma que contiene abundantes células fusiformes y ovoides de aparente origen mioepitelial (Figura 1). El área mixoide compuesta por la proliferación de células fusiformes, ovoides y estelares (con forma de estrella) separadas por abundante matriz extracelular de aspecto mucoide con diferentes afinidades tintoreales, o escasamente colagenizada (Figura 2). El área condroide formada por cartilago maduro o células ovoides estelares y de aspecto condroide, vacuoladas, en ocasiones rodeadas por un halo pericelular y separadas por matriz extracelular de apariencia cartilaginosa (Figuras 3 y 4). El área osteoide compuesta invariablemente por trabéculas de matriz osteoide, ocasionalmente mineralizada, rodeada por osteoblastos y osteoclastos y en algunos casos con desarrollo de médula ósea y elementos hematopoyéticos (Figura 5).

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las áreas seleccionadas a partir de las muestras previamente evaluadas por inmunoperoxidasa fueron desparafinadas con xilol, hidratadas en concentración descendente de alcoholes al 100, 96, 90, 80, 70, 60 y 50%; post fijadas en tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas, lavadas en una solución amortiguadora de cacodilatos al 0.1M, deshidratadas en concentración ascendente de alcoholes al 50, 60, 70, 80, 90, 96 y 100%, para ser incluidas en cápsulas de gelatina con resina epóxica (EPON-812) e incubadas durante 18 horas a 70°C para su polimerización. Posteriormente se realizaron los corte semifinos en un ultramicrotomo Porter Blume MT-2, fueron teñidos con paragón y observados en un microscopio de luz para escoger los campos que se llevaron a cortes

finos, utilizando soluciones acuosas de acetato de uranilo y citrato de plomo como medios de contraste. Estos cortes finos fueron observados en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 900, fotografiados a 12000, 7000 y 4400 aumentos y amplificados x 4 revelados en blanco y negro en papel Kodak tamaño carta.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

La información obtenida en cuanto al patrón de inmunorreactividad celular, intensidad de la reacción y hallazgos ultraestructurales de los elementos celulares que proliferan y experimentan metaplasia, fue ordenada en una base de datos (d-Base 3plus) y dividida en cuatro áreas principales (adenomatosa, mixoide, condroide y osteoide), presentes en cada tumor. Los datos se vaciaron en tablas de contingencia para poder realizar pruebas de X^2 , con el propósito de determinar asociación estadísticamente significativa, entre el grado de intensidad de la reacción por inmunoperoxidasa y su correspondiente patrón de distribución en cada área; así como, entre cada una de las variables antes mencionadas y sus hallazgos ultraestructurales. Los resultados obtenidos se informan en cuadros preferentemente de contingencia.

RESULTADOS

TESTIGOS

En la evaluación de los anticuerpos comerciales usados para tejidos humanos en los tejidos control, provenientes de caninos, se observó que CK resultó fuertemente positiva en forma difusa en epitelios normales de glándula mamaria, glándula salival, glándulas sudoríparas apócrinas y células escamosas neoplásicas; fue negativo en toda clase de tejidos mesenquimatosos como hueso y cartilago normales y neoplásicos, músculo liso, músculo estriado, tejido conectivo y tejido adiposo. El anticuerpo contra EMA fue débilmente positivo en forma difusa en epitelios normales de glándula mamaria, salival (conductos) y sudoríparas, así como en el material de secreción presente en el tejido mamario residual de algunos de los tumores en cuestión. Los distintos tejidos mesenquimatosos también fueron negativos para EMA. El anticuerpo contra el CEA resultó positivo difusamente en células epiteliales lumbales de tejidos normales, epitelio escamoso neoplásico, e histiocitos, sin embargo, fue negativo en tejidos mesenquimatosos normales y neoplásicos. El anticuerpo contra VIM marcó fuertemente positivo y en forma difusa para mioepitelio y epitelio de los conductos de glándulas salivales, mioepitelio de glándulas sudoríparas, tejido conectivo (fibroblastos), músculo liso vascular, cartilago y hueso normales y neoplásicos; así como, en el estroma del carcinoma epidermoide; sin embargo, fue negativo en epitelio y mioepitelio de glándula mamaria normal y en las células escamosas neoplásicas. En el caso de MSA, el anticuerpo demostró una fuerte positividad en forma difusa para mioepitelio de glándula mamaria salival, músculo liso vascular y músculo estriado; fue débilmente positivo en cartilago y hueso neoplásico; y negativo, en epitelios normales y neoplásicos así como cartilago y hueso normales. Con PS-100, la inmunorreactividad para cartilago normal fue débilmente positiva y focal; en el caso de nervios, melanocitos, glándulas sudoríparas y mioepitelio de glándula salival, resultó dudoso; y, en el resto de los constituyentes tisulares, fue negativa. Finalmente, el anticuerpo utilizado contra DESM marcó fuertemente al músculo liso vascular y estriado en forma intermedia y fue negativo para el resto de los tejidos.

La especificidad de los anticuerpos primarios se corroboró indirectamente por medio de su sustitución con anticuerpos inespecíficos presentes en líquido ascítico de ratón al ser negativa la reacción en cada tejido. Con ello se descarta la posibilidad de una inespecificidad por parte de los tejidos en estudio. Asimismo, los controles positivos (tejidos humanos) confirmaron la viabilidad de los anticuerpos, al reaccionar estos últimos en la forma esperada.

INMUNORREACTIVIDAD EN TUMORES MIXTOS.

El anticuerpo para CK resultó fuertemente positivo con distribución difusa en las células epiteliales que revisten a los conductos y papilas intraductales, localizadas en el área adenomatosa; las células mioepiteliales ubicadas junto a la membrana basal y la mayoría de los elementos que proliferan en el área mixoide, fueron negativos o dudosos (Figura 6). En torno al área cartilaginosa se observaron focos de células estelares débilmente positivas, siendo negativa la reacción en cartilago maduro y hueso. Los marcadores para CEA y EMA fueron débilmente positivos en forma difusa para las células epiteliales mientras que CEA resultó débilmente positivo para algunos grupos de células transicionales, estelares y condroides en las áreas mixoide y cartilaginosa, así como EMA fué dudoso y focal en las células transicionales (Figura 7). En el caso de MSA, el anticuerpo marcó fuertemente positivo con distribución difusa en las células mioepiteliales junto a la membrana basal de los conductos y papilas intraductales, sin embargo, a medida que las células proliferaban en el área mixoide y en las zonas precartilaginosas (células estelares y condroides), se tornaban débilmente positivas (Figuras 8 y 9). En algunos casos se apreciaron zonas de tejido con apariencia de músculo liso (mioides) de escasa celularidad y matriz colagenizada, en donde MSA era débilmente positiva. Tanto el cartilago maduro como el hueso fueron negativos. El marcador para VIM fue fuertemente positivo y difuso en las células mioepiteliales de los conductos, en las células que ocupaban el área mixoide, y en las células estelares y condroides, aún en las áreas de cartilago maduro (Figuras 10,11 y 12). Los osteoblastos resultaron débilmente positivos a VIM. En el caso de PS-100, únicamente las células de las zonas precartilaginosa y condroide marcaron débilmente con distribución intermedia; en el área mixoide hubo algunos focos de células en transición, débilmente positivas. El resto de los constituyentes, resultaron negativos. Para DESM, únicamente algunas

células alargadas en las denominadas áreas "mioides" resultaron positivas, así como en el músculo liso vascular. Los demás elementos del tumor mixto fueron negativos para este anticuerpo.

HALLAZGOS ULTRAESTRUCTURALES

Como se mencionó anteriormente los tumores fueron divididos en cuatro áreas principales (adenomatosa, mixoide, condroide y osteoide), en cada una de las cuales se observaron 6 diferentes tipos celulares, que fueron clasificados con base en sus características ultraestructurales.

Las *células epiteliales* lumbales, localizadas en el borde apical de conductos y acinos, principalmente en el área adenomatosa, se caracterizaron por ser poliédricas y presentar desmosomas y uniones estrechas con otras células epiteliales. El núcleo era ovoide, redondo o de forma irregular, las mitocondrias eran relativamente grandes, sin embargo, la mayoría estaban crenadas, posiblemente debido al proceso de desparafinación del tejido. También presentaban un retículo endoplásmico bien desarrollado con cisternas dilatadas además de filamentos de 8 a 10 nm de grosor orientados al azar y un segundo tipo de filamentos de 5 a 8 nm orientados hacia las zonas apicales del citoplasma. En algunos casos se aprecian luces intracitoplásmicas con microvellosidades que se proyectan, así como luces formadas por la unión de varias células (**Figura 13**).

Las *células mioepiteliales* presentes principalmente en las áreas adenomatosas y con menos frecuencia en las áreas mixoides, generalmente se hallaban en contacto con una membrana basal, unidas a ella por hemidesmosomas o bien unidas a otras células epiteliales y mioepiteliales por desmosomas. Su forma era alargada o irregular, el núcleo, redondo, ovoide o irregular con heterocromatina y en ocasiones un nucleolo aparente. En estas células también fueron identificados 2 tipos de filamentos, los más delgados cuyo diámetro era de 5 a 8 nm, esparcidos en el citoplasma, o bien, distribuidos en paquetes compactos. Los filamentos más gruesos cuyos diámetros oscilaban entre 8 y 10 nm, eran más electrodensos y estaban distribuidos entre los filamentos delgados. Además algunas células mioepiteliales presentaban cuerpos densos de contornos irregulares, distribuidos de igual forma, en el citoplasma; y un retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado (**Figura 14**).

Las *células filamentosas*, consideradas como un estadio transicional, constituían el principal tipo celular en las áreas mixoides, aunque también se podían encontrar en las áreas condroides y adenomatosas. En éstas últimas, se localizaban principalmente entre las células epiteliales lumbinales y las células mioepiteliales o la membrana basal. En la medida en que las células filamentosas se hacían más numerosas, aumentaba el espacio entre ellas, el cual estaba ocupado por matriz intercelular mucoide o condroide de las zonas correspondientes. Así mismo, las células más alejadas de la zona adenomatosa perdían sus uniones tipo desmosoma y hemidesmosoma. El núcleo de estas células era ovoide o irregular, en ocasiones con uno o dos nucleolos prominentes. El citoplasma era por lo regular electrodensito debido a la gran cantidad de filamentos orientados en distintas direcciones, en ocasiones paralelos al eje longitudinal de la célula o bien alrededor del núcleo. Dichos filamentos median por lo regular de 8 a 10 nm de diámetro, sin embargo, en algunos casos el grosor que predominaba era de 5 a 8 nm. Ocasionalmente se observaron cuerpos densos similares a los descritos en las células mioepiteliales (Figura 15).

Las *células estelares* denominadas de esta manera por su forma de estrella, se caracterizaban por presentar prolongaciones citoplásmicas pronunciadas. Dichas células eran mucho menos numerosas que las filamentosas y se hallaban por lo general, separadas por la formación de grandes espacios intercelulares o bien aisladas por abundante sustancia intercelular, en las zonas mixoide y condroide. Su núcleo era oval o irregular con nucleolos aparentes y heterocromatina relativamente abundante. El citoplasma presentaba abundantes filamentos gruesos y delgados de diámetros similares a los descritos en las células mioepiteliales y filamentosas con aparente predominio de filamentos de 5 a 8 nm. Asimismo, se observaron cuerpos densos así como gotas de lípidos dentro del citoplasma y era más difícil observar algún tipo de unión intercelular (Figura 16).

Las *células condroides* incluyen formas precartilaginosas y células parecidas a condrocitos. Las primeras eran más abundantes sobre todo en las zonas de cartilago inmaduro y en las áreas periféricas de cartilago maduro. Se caracterizaban por presentar grandes gotas de lípidos en su citoplasma y aún se observaban filamentos principalmente de 8 a 10 nm de grosor. Los cisternas de retículo endoplásmico

comenzaban a dilatarse para formar grandes espacios dentro del citoplasma y ocasionalmente se apreciaban gránulos de glucógeno dispersos así como algunos lisosomas (Figura 17). Las células que se asemejaban a condrocitos eran de forma irregular con abundantes procesos citoplásmicos aislados e inmersas en matriz condroide. Dichas células presentaban además cambios degenerativos avanzados caracterizados por la dilatación de cisternas de retículo endoplásmico y núcleo con abundante heterocromatina, de contornos irregulares (Figura 18). Era difícil apreciar cambios en otros organitos como mitocondrias, Aparato de Golgi y lisosomas debido al proceso de desparafinación al que fueron sometidos los tejidos. Por otro lado, se apreciaban abundantes cuerpos densos generalmente redondos de características diferentes a las mencionadas en las células mioepiteliales.

Finalmente las células osteoides localizadas exclusivamente en los bordes de las trabéculas de matriz osteoide, eran escasas y presentaban las características típicas en los osteoblastos como son forma oval con prolongaciones citoplásmicas, núcleo oval o redondo, excéntrico con cromatina concentrada en la periferia o formando nucleolos y retículo endoplásmico bien desarrollado; en ocasiones con dilatación de sus cisternas. En torno a estas áreas, podían observarse células condroides con cambios degenerativos y algunas células estelares.

TRATAMIENTO ESTADISTICO

Como se describió en el procedimiento, para llevar a cabo un análisis estadístico, se realizaron tablas de contingencia y pruebas de χ^2 para una muestra de 15 casos, con la finalidad de cuantificar asociación entre el patrón de distribución e intensidad de la reacción para cada anticuerpo, así como con el tipo y la cantidad de células identificadas por microscopía electrónica en relación con las variables de inmunorreactividad antes citadas. Sin embargo, no fue posible realizar la prueba de χ^2 en todas las tablas de contingencia. Por tanto no fue posible cuantificar la intensidad de la asociación por medio de la prueba referida en estos casos. Al analizar las tablas de contingencia se observó que dos casos presentaron una asociación del 100% ($p < 0.01$) ya que las quince muestras tuvieron una reacción fuertemente positiva y con distribución difusa para CK y

MSA en las células epiteliales y mioepiteliales respectivamente, dentro del área adenomatosa.

Únicamente en 6 casos fue posible llevar a cabo la prueba de χ^2 para medir asociación entre intensidad y distribución de la reacción de los marcadores por inmunoperoxidasa, en ninguno de los cuales se observó un grado de asociación significativa desde la perspectiva estadística ($p > 0.05$), (Cuadro 1). Asimismo, fue factible desarrollar la misma prueba en 23 casos para medir asociación entre intensidad y distribución de la reacción de los marcadores por inmunoperoxidasa con la cantidad de células de cada área por microscopía electrónica. En dichos casos tampoco se observó un grado de asociación significativa, desde el punto de vista estadístico. ($p > 0.05$) (Cuadros 2 y 3). Lo anterior se atribuye a que el número de casos en estudio fue limitado para llevar a cabo dicha prueba, así como a la imposibilidad de aglutinar renglones o columnas en las tablas de contingencia, o bien, a que, en algunos casos, no fue posible llevar a cabo el análisis a pesar de la aglutinación de renglones y columnas en las mismas tablas. Sin embargo, el ordenamiento de los resultados y la revisión de los mismos en tablas de contingencia, permitió realizar la descripción que a continuación se discute.

DISCUSION

De acuerdo a los hallazgos informados por otros autores, la mayoría de los marcadores utilizados por inmunoperoxidasa en el presente trabajo, fueron considerados como confiables, durante su evaluación en los testigos correspondientes, incluyendo a los tumores mixtos; ya que por lo regular se obtuvo la inmunorreactividad esperada, excepto en el caso de PS-100 (2,12,28,33,52,54).

Como se describió en los resultados, EMA, CEA y CK, reaccionaron de acuerdo a lo esperado, como marcadores de elementos epiteliales; de hecho, la reacción para CK, fue casi siempre intensa en tejidos normales y neoplásicos, sin embargo, las células mioepiteliales no neoplásicas resultaron negativas en los testigos normales y controles internos similar a lo informado por Morinaga y Cols y (28). En las áreas adenomatosas y mixoides de los tumores mixtos, las células mioepiteliales y en transición eran débilmente positivas a CK, lo cual concuerda con algunos trabajos (12,28,52).

El marcador para MSA resultó ser un excelente indicador de células mioepiteliales en tejidos normales y neoplásicos, así como, músculo liso vascular de los tejidos residuales, sin embargo, la intensidad disminuía a medida que las células que proliferaron, se alejaban del área adenomatosa y, era nula en las áreas de cartilago maduro, probablemente debido a la pérdida de proteínas contráctiles durante el proceso de desdiferenciación mioepitelial y diferenciación hacia cartilago.

Vimentina es uno de los llamados filamentos intermedios que conforman al citoesqueleto al igual que CK y DESM, se denominan intermedios debido a que su tamaño se ubica entre el de los microfilamentos (4 a 6 nm) y los microtúbulos (25 nm). El primero, no es específico y está presente en una gran variedad de células y tejidos, como es el caso del músculo liso vascular, en la mayoría de sarcomas, en melanomas, linfomas y en algunas neoplasias de estirpe epitelial. De hecho, algunos laboratorios, utilizan a VIM como un control de tinción obligado con el fin de verificar la preservación de antígenos en el tejido en estudio (4,28,33). En nuestro trabajo, el anticuerpo para VIM reaccionó conforme a lo esperado al reaccionar intensamente y en forma difusa en la mayoría de los tejidos testigos y en estudio. De igual forma a lo informado por Morinaga y Cols(28) en la glándula mamaria normal no hubo reacción en las células mioepiteliales, tal como

sucedió en CK. En el caso de los tumores mixtos, únicamente los elementos epiteliales resultaron negativos o dudosos, mientras que las células mioepiteliales así como las células en transición, las condroides y osteoides, eran fuertemente positivas a VIM, esto último probablemente se debe a que la expresión de VIM aumentaba a medida que las células perdían cohesión, contrario a lo observado con CK cuya intensidad está influida por el grado de contacto entre célula y célula. Lo anterior puede constituir una característica de las células mioepiteliales normales y neoplásicas (5).

Asimismo, podemos afirmar con base en la expresión de VIM que la conservación de los tejidos utilizados es lo suficientemente confiable para la interpretación de los demás marcadores, tomando en cuenta también, los resultados obtenidos en los controles negativos y positivos.

Como se mencionó, DESM es otro filamento intermedio, presente en todo tipo de tejido muscular, a nivel de las líneas "Z" que sirven para interconectar filamentos en este tipo de células. Si bien el anticuerpo para DESM reaccionó en el músculo liso vascular en los controles internos, así como, en algunas células aisladas de las áreas mioides; las células mioepiteliales y las células de transición, resultaron negativas a diferencia de lo encontrado por otros autores⁽²⁸⁾. Por otro lado, la reacción para PS-100 fue negativa en la mayoría de los elementos que normalmente la manifiestan, como en el mioepitelio normal y neoplásico de glándula mamaria y salival; en glándulas sudoríparas, nervios periféricos, melanocitos, etc. Únicamente se observaron algunos focos débilmente positivos en las áreas de transición mixoides, precondroides y cartilago. Tomando en cuenta que la expresión de PS-100 en el control positivo (melanoma) resultó intensa y difusa, podemos pensar que la especificidad de especie del anticuerpo explica los resultados en tejidos caninos.

Los hallazgos ultraestructurales en el presente trabajo son similares a los descritos por Tateyama y Kaldrymidou en sus respectivas investigaciones^(23,50). Básicamente se describen 6 tipos celulares que permiten seguir, una secuencia lógica de transformación a partir de las células mioepiteliales que empiezan a proliferar en las áreas adenomatosas, hasta la formación de cartilago maduro. Se ha considerado que algunos de los principales marcadores ultraestructurales de las células mioepiteliales son: su relación con membrana basal, la presencia de desmosomas y hemidesmosomas,

miofilamentos de actina (5 a 7 nm), cuerpos densos y vesículas pinocitóticas. En nuestro trabajo, las últimas no se observaron, probablemente debido a que los tejidos en estudio, fueron sometidos a desparafinación para su evaluación ultraestructural, o bien, a que la preservación de las muestras no fuera la idónea. Las células filamentosas, estelares y condroides, mantienen algunas características en común con las mioepiteliales, como, la presencia de filamentos de actina, desmosomas, cuerpos densos y fragmentos de membrana basal, que tienden a desaparecer en las zonas de cartilago bien diferenciado. Los denominados cuerpos densos, frecuentes en muchas de las células neoplásicas, probablemente correspondan a agregados de tonofilamentos (filamentos intermedios) de 8 a 10 nm de grosor⁽⁵⁰⁾. Por otro lado, los gránulos electrodensos irregulares, presentes en las células y matriz condroide, pueden corresponder a las síntesis de glicoproteínas características de este tejido⁽²³⁾.

La conservación de miofilamentos de actina y de filamentos intermedios (8 a 10 nm) como CK y VIM, en la mayoría de los componentes neoplásicos mesenquimatosos, apoya la teoría de que los mismos, se originan de una célula en común con características mioepiteliales. Asimismo, es bien conocida la capacidad que las células mioepiteliales tienen para diferenciarse en distintos elementos mesenquimales, y producir mucopolisacáridos ácidos, matriz mixoide, colágena y matriz cartilaginosa, particularmente bajo condiciones patológicas^(1,54).

De manera similar a lo informado por Bomhard y Cols⁽⁶⁾, no se encontró evidencia que indique que las células mioepiteliales o transicionales, den lugar a la formación de hueso y osteoide en forma directa. Al parecer este último es formado por osificación endocondral, y las células que participan en la osificación endocondral de los tumores mixtos son indistinguibles de células normalmente encontradas en dicha transformación, ésto está apoyado por la observación de que únicamente fue factible encontrar focos de tejido osteoide, en torno o dentro, de cartilago generalmente maduro.

En cuanto al componente epitelial neoplásico que prolifera casi en forma paralela con las células mioepiteliales para formar conductos, acinos, papilas o nidos, aún en las áreas mixoides; posiblemente deriva de las células localizadas en la membrana basal con capacidad de desarrollar una diferenciación divergente, epitelial y mioepitelial, como parece ocurrir en los adenomas pleomorfos de la glándula salival y mamaria del humano.

y cuya imagen histológica es notablemente similar a los tumores mixtos de glándula mamaria canina (12).

De todo lo anterior, se concluye que, los resultados obtenidos en el análisis por inmunoperoxidasa y microscopía electrónica, en este trabajo, dan continuidad a las observaciones realizadas por otros autores, para confirmar que las células mioepiteliales son las responsables de la formación de tejido mixoide, cartilago e indirectamente tejido óseo, en los denominados tumores mixtos de glándula mamaria canina. Por otro lado, la mayoría de los marcadores comerciales utilizados para la técnica del complejo avidina-biotina peroxidasa, fueron de utilidad para llevar a cabo este estudio. De estos resalta la reacción para CK, MSA, y VIM quienes proporcionaron datos importantes para correlacionar ultraestructuralmente. De tal manera que, es recomendable el manejo de técnicas de inmunoperoxidasa para realizar trabajos similares en canideos, aún utilizando marcadores para humanos; siempre y cuando se utilicen los controles apropiados para cada uno y se verifique previamente si son confiables en tejidos caninos.

Es factible que tanto las células epiteliales como las mioepiteliales, se originen de una célula precursora común con capacidad de presentar una diferenciación divergente. De ser así, se puede proponer otra nomenclatura para designar a estas lesiones como es, la de adenoma pleomorfo, cuyo término indica, un origen celular común; ya que la denominación de tumor mixto puede significar un crecimiento heterogéneo de *ново* a partir de distintos componentes a la vez. No obstante, hacen falta más trabajos para comprobarlo.

El presente trabajo proporciona conocimientos básicos, en torno a la patología neoplásica de la glándula mamaria de la perra. En este caso el conocimiento de la histogénesis en un tumor de aspecto histológico tan variable y complejo, es determinante para su clasificación y denominación correcta; ya que, una vez establecido lo anterior, se crea la necesidad de investigar con respecto a su etiología, comportamiento biológico y pronóstico, éstos últimos, mediante estudios de correlación clínico-patológica, fundamentales para crear medidas profilácticas y/o terapéuticas. Por otro lado, este tipo de trabajos, llevados a cabo en canideos, puede proporcionar información de utilidad en

la patología neoplásica de la glándula mamaria y salival del humano, ya que existen lesiones con características morfológicas muy similares en el último.

LITERATURA CITADA

1. Allen, A.C.: So-called mixed tumors of the mammary gland of dog and man. With special reference to the general problem of cartilage and bone formation. *Arch. Path.*, 29: 589-624 (1940).
2. Arai, K., Uehara, K., Nagai, Y.: Expression of type II and type XI collagens in canine mammary mixed tumors and demonstration of collagen production by tumor cells in collagen gel culture. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 80: 840-847 (1989).
3. Auler, H. and Wernicke: Über Tumoren des Hundes. *Ztschr. Krebsforsch.*, 35: 1-49 (1932).
4. Battifora, H. : Curso precongreso. "Inmunohistoquímica aplicada". Memorias de la XXXV Reunión anual en Provincia de la Asociación Mexicana de Patólogos. Puebla, México, 1992.
5. Ben-Ze'ev, A.: Differential control of cytokeratins and vimentin synthesis by cell-cell contact and cell spreading in cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 99: 1424 (1984).
6. Biggs, R.: The myoepithelium in certain tumors of the breast. *J. Path and Bact.*, 59: 437-444 (1947).
7. Bloom, F.: Pathology of the dog and cat. *American Veterinary Publications, Inc.*, Evanston, IL, 1954.
8. Bomhard, von, D., Schaeffer, E., Sandersleben, von, J.: Histogenesis of osseous structures in epithelial tumours. A light and electron microscopic study on the so called mixed tumour of the mammary gland in bitches. *Z. Krebsforsch.*, 89: 19-29 (1977).
9. Caselitz, F. : Östrogen- und Progesteron receptoren im Mammagewebe und Mammatumorgewebe der Hundin. Thesis. *Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany*, 1984.
10. Cotchin, E.: Mammary neoplasms of the bitch. *J. Comp. Path.*, 68: 1-22 (1958).
11. Dahme, E. and Wiess, E.: Zur Systemetik der Mammatumoren des Hundes. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 65: 458-461 (1958).
12. Diaz, D.M., Mc Divitt, R.W. and Wick, M.R.: Pleomorphic Adenoma of the Breast: A clinico pathologic and immunohistochemical Study of 10 cases. *Hum. Pathol.*, 22: 1206-1214 (1991).
13. Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Frye, F.L. and Hibbard, H.H.: Survey of animal neoplasms in Alameda and Contra Costa Counties California. I. Methodology and description of cases. *J. Natl. Cancer Inst.*, 40: 295-305 (1968).

14. Feldman, W.H. Neoplasms of domesticated animal. Mayo Clinic Monographs. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1932.
15. Frye, F.L., Dorn, C.R., Taylor, D.O.N., Hibbard, H.H. and Klauber, M.R.: Characteristics of canine mammary gland tumor cases. *Anim. Hosp.*, 3: 1-12 (1967).
16. Harvey, H.J. and Gilbertson, S.R.: Canine mammary gland tumors. *Vet. Clin. North Am.*, 5: 495-506 (1975).
17. Hampe, J.F. and Misdorp, W.: Tumours and dysplasias of the mammary gland. *Bull. Wild. Hlth. Org.*, 50: 111-133 (1974).
18. Hampert H. : Über die Myothenien (myoepithelialen elemente) der Brustdüse. *Virchows Arch. path. Anat.*, 305: 171-215 (1940).
19. Hsu, S.M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577 (1984).
20. Huggins, C. and Moulder, P.V.: Studies on the mammary tumors of dogs. *J. Exp. Med.*, 80: 441-454 (1944).
21. Huvos, A.G., Lucas, J.C., Foote, F. W.: Metaplastic breast carcinoma. *N.Y. State J. Med.*, 73: 1078-1081 (1973).
22. Jabara, A.G.: Canine mixed tumors. *Austr. Vet. J.*, 36: 212-221 (1960).
23. Kaldrymidou E., Kanakoudis, G., Tsangaris, T. Karagiannopoulou, M. : Metaplastic stages of myoepithelial cells in canine mammary mixed tumor. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society.*, 37: 156-169 (1986).
24. Karelina, T.V., Golubeva, V.A.: Immunomorphological identification of myoepithelial cells in mixed tumors of the mammary gland in dogs. *Byull. Eksp. Biol. Med.*, 95: 93-94 (1983).
25. Kaufman, M.W., Marti, J.R., Gallager, H. S. and Hoehn, J. L.: Carcinoma of breast with pseudosarcomatous metaplasia. *Cancer*, 53: 1908-1917 (1984).
26. Mac Vean, D.W., Montlux, A. W., Anderson, P.S., Silberg, S.L. and Roszel, J.F.: Frequency of canine and feline tumors in a defined population. *Vet. Path.*, 15: 700-715 (1978).
27. Misdorp, W., Cotchin, E., Hampe, J. F., Jabara, A. G., Sanderleben, Von J.: Canine malignant mammary tumors. III special types of carcinomas, malignant mixed tumors. *Vet. Path.*, 10: 241-256 (1973).

28. Morinaga, S., Nakajima, T. and Shimosato, Y.: Normal and Neoplastic Myoepithelial cells in Salivary Glands: An immunohistochemical study. *Hum. Pathol.*, 18: 1218-1226 (1987).
29. Moulton, J. E., Taylor, D.O.N., Dorn, C.R., Andersen, A.C.: Canine mammary tumors. *Path. Vet.*, 7: 289-320 (1970).
30. Moulton, J. E.: Tumors in domestic animals, 3rd. ed. *California Press*, California, 1990.
31. Mulligan, R.M.: Some endocrinologic considerations of canine neoplastic diseases. *Arch. Pathol.*, 39: 162-171 (1945).
32. Mulligan, R.M.: Neoplasms of the dog. *Williams and Wilkins Company*, Baltimore, 1949.
33. Nadji, M. and Azoride, R. M.: Immunoperoxidase techniques: A practical approach to tumor diagnosis. *American Society of clinical Pathologists*, Chicago, 1986.
34. Nieberle, K.: Zur Kenntnis der dog. Mammamischgeschwulste des Hundes. *Ztschr. Krebsforsch.*, 39: 113-127 (1933).
35. Oberman, H.A.: Metaplastic carcinoma of the breast. A clinicopathologic study of 29 patients. *Am. J. Surg. Pathol.*, 11: 918-929 (1989).
36. Palmer, T.E. and Monlux, A.W.: Acid Mucopolysaccharides in Mammary Tumors of Dogs. *Vet. Pathol.* 16: 493-509 (1979).
37. Peyron, A.: Développement des tumeurs de la glande mammaire chez la chienne. *Rev. Vet. Toulouse*, 76: 764-765 (1924).
38. Prier, J. E. and Brodey, R. S.: Canine neoplasia: A prototype for human cancer study. *Bull. Wild. Hith. Org.*, 29: 331-344 (1963).
39. Pulley, L.T.: A study of myoepithelium in canine mammary mixed tumours. *Vet. Bull*, 42: 224 (1972).
40. Pulley, L. T.: Ultrastructural and histochemical demonstration of mioepithelium in the normal canine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1505-1512 (1973).
41. Pulley, L. T.: Ultrastructural and histochemical demonstration of mioepithelium in mixed tumors of the canine mammary gland. *Am. J. Vet. Res.* 34: 1513-1522 (1973).
42. Rosai, J. Ackerman's Surgical Pathology. 7th ed. *C.V. Mosby Company*, St. Louis. Missouri, 1989.

43. Sandersleben, J. von: Die Myoepithelzelle und ihre Bedeutung für die Histogenese der Mammaturmoren der Hündin. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 89: 67-71 (1976).
44. Sasadaira, H.: Comparative pathological studies on canine mammary gland tumors and human breast and salivary gland mixed tumors. Morphology of the neoplastic myoepithelial cells in the tumors. *Bull. Azabu. Vet. Coll.*, 1: 1-14 (1976).
45. Schlotke, B.: Histochemische Untersuchungen zur Rolle der Myoepithelzellen bei der Morphogenese von Mamma-tumoren der Hündin. *Zentralblatt für veterinärmedizin*, 23A: 661-682 (1976).
46. Schmidt, I.: Zur Frage der Entstehung der Mischgewächse an Hand von zwei Fällen von Milchdrüsenmischgeschwülsten des Hundes. *Virchows Arch. Path. Anat.*, 291: 491-506 (1933).
47. Schneider, R., Dorn, R. C., Taylor, D.O.N.: Factor influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43: 1249-1261 (1969).
48. Smith, B. H., Taylor, H. B.: The occurrence of bone and cartilage in mammary tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*, 51: 610-648 (1969).
49. Tateyama, S., Cotchin, E.: Alkaline phosphatase reaction of canine mammary mixed tumors: a light and electron microscopic study. *Res. Vet. Sci.*, 23: 356-364 (1977).
50. Tateyama, S., Cotchin, E.: Electron microscopic observations on canine mixed mammary tumors, with special reference to cytoplasmic filamentous components. *Am. J. Vet. Res.*, 39: 1494-1501 (1978).
51. Tateyama, S., Yamamoto, S., Ishida, K., Ashizawa, H. and Mosaka, D.: Histochemical Study of the mucoid and chondroid tissue in canine mixed mammary tumours. *Bulletin of the Faculty of Agriculture, Miyazaki University* 25: 161-169 (1978).
52. Tavassoli, F.A.: Myoepithelial Lesions of the Breast. Myoepitheliosis, Adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* 15: 554-568 (1991).
53. Taylor, C.R.: Immunomicroscopy: a diagnostic tool for the surgical pathologist. *W.B. Saunders Company, Philadelphia*, 1986.
54. Wargotz, E.J. and Norris, H. J.: Metaplastic carcinomas of the breast. I. Matrix-producing carcinoma. *Hum. Pathol.*, 20: 628-635 (1989).

CUADRO 1. ASOCIACION ENTRE INTENSIDAD Y DISTRIBUCION DE LA REACCION POR INMUNOPEROXIDASA MEDIANTE LA PRUEBA DE CHI CUADRADA

ANTICUERPO	AREA	VARIABLES EVALUADAS	CHI CUADRADA CALCULADA	P
EMA	ADENOMATOSA	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	0.8	>0.05
EMA	MIXOIDE	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	1.9	>0.05
CK	MIXOIDE	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	1.5	>0.05
CEA	ADENOMATOSA	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	2.15	>0.05
CEA	MIXOIDE	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	0.77	>0.05
MSA	MIXOIDE	INTENSIDAD-DISTRIBUCION	0.37	>0.05

CUADRO 2. ASOCIACION ENTRE INTENSIDAD DE LA REACCION POR INMUNOPEROXIDASA Y CANTIDAD DEL TIPO CELULAR EN UN AREA DETERMINADA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA, MEDIANTE LA PRUEBA DE CHI CUADRADA.

ANTICUERPO	AREA	VARIABLES EVALUADAS	P
EMA	ADENOMATOSA	INTENSIDAD-EPITELIALES	>0.05
EMA	MIXOIDE	INTENSIDAD-MIOEPITELIALES	>0.05
EMA	MIXOIDE	INTENSIDAD-ESTELARES	>0.05
CEA	ADENOMATOSA	INTENSIDAD-EPITELIALES	>0.05
PS-100	CONDROIDE	INTENSIDAD-CONDROIDES	>0.05
PS-100	MIXOIDE	INTENSIDAD-MIOEPITELIALES	>0.05
PS-100	MIXOIDE	INTENSIDAD-FILAMENTOSAS	>0.05
PS-100	MIXOIDE	INTENSIDAD-ESTELARES	>0.05

CUADRO 3. ASOCIACION ENTRE DISTRIBUCION DE LA REACCION POR INMUNOPEROXIDASA Y CANTIDAD DEL TIPO CELULAR EN UN AREA DETERMINADA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA, MEDIANTE LA PRUEBA DE CHI CUADRADA

ANTICUERPO	AREA	VARIABLES EVALUADAS	P
EMA	MIXOIDE	DISTRIBUCION-MIOEPITELIALES	>0.05
EMA	MIXOIDE	DISTRIBUCION-FILAMENTOSAS	>0.05
CEA	ADENOMATOSA	DISTRIBUCION-EPITELIALES	>0.05
CEA	MIXOIDE	DISTRIBUCION-MIOEPITELIALES	>0.05
CEA	MIXOIDE	DISTRIBUCION-FILAMENTOSAS	>0.05
CEA	CONDROIDE	DISTRIBUCION-CONDROIDES	>0.05
CK	MIXOIDE	DISTRIBUCION-MIOEPITELIALES	>0.05
CK	MIXOIDE	DISTRIBUCION-FILAMENTOSAS	>0.05
CK	MIXOIDE	DISTRIBUCION-ESTELARES	>0.05
CK	CONDROIDE	DISTRIBUCION-CONDROIDES	>0.05
VIM	MIXOIDE	DISTRIBUCION-MIOEPITELIALES	>0.05
VIM	MIXOIDE	DISTRIBUCION-FILAMENTOSAS	>0.05
VIM	MIXOIDE	DISTRIBUCION-ESTELARES	>0.05
PS-100	MIXOIDE	DISTRIBUCION-ESTELARES	>0.05
PS-100	CONDROIDE	DISTRIBUCION-CONDROIDES	>0.05



Figura 1. Area adenomatosa en un Tumor Mixto de glándula mamaria canina, caracterizada por la formación de papilas intraductales (P) sostenidas por un estroma con proliferación mioepitelial. H&E, 100x

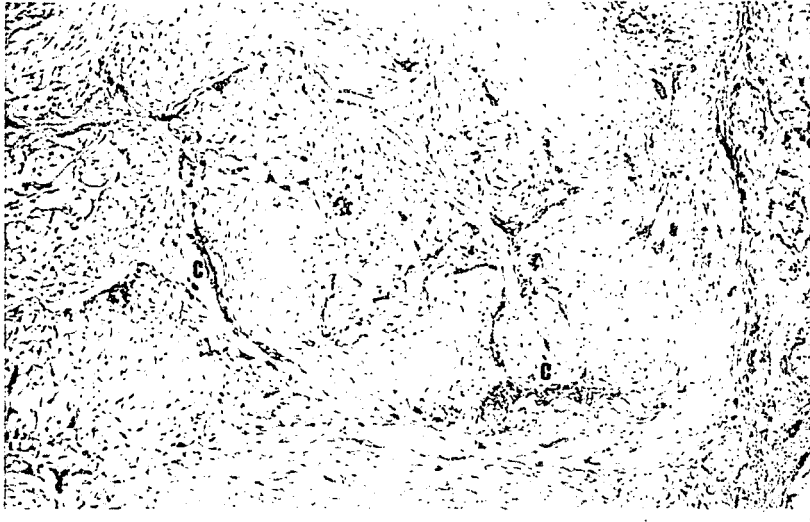


Figura 2. Area mixoide, compuesta por la proliferación de células fusiformes y estelares separadas por abundante sustancia intercelular. Nótese la presencia de conductos glandulares colapsados (C). H&E, 100x.

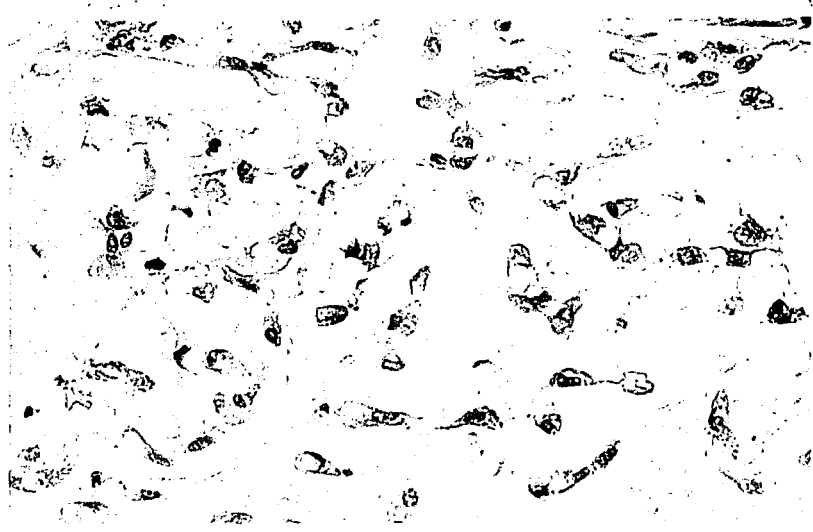


Figura 3. Area condroide en la cual se observan células precartilaginosas con forma de estrella, separadas por matriz de aspecto cartilaginoso. H&E, 400x.

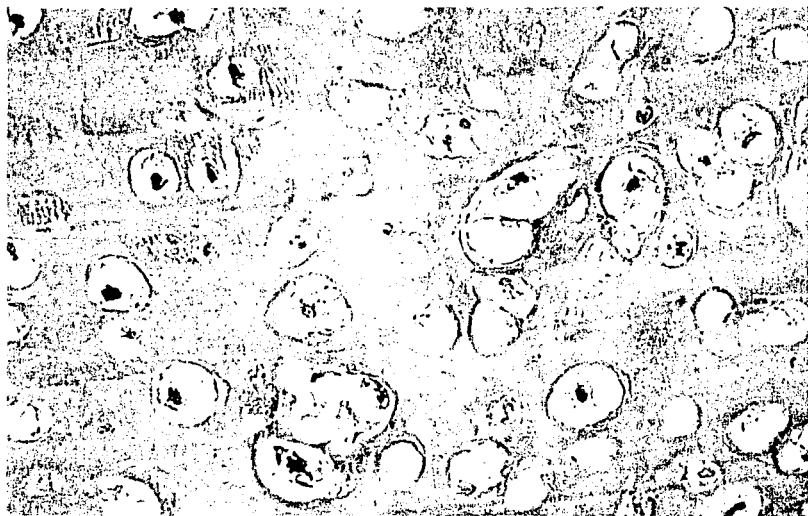


Figura 4. Area de cartilago maduro en un Tumor Mixto de glándula mamaria de perra. H&E, 400x.

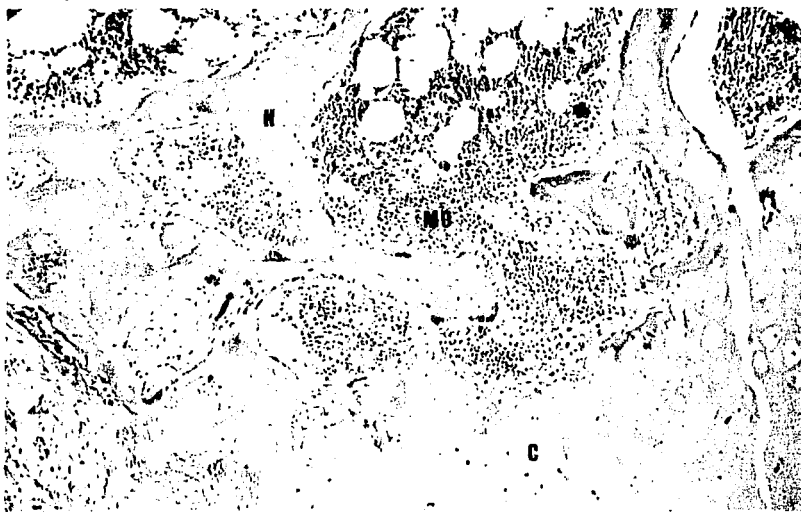


Figura 5. Corte histológico correspondiente a un área osteoide en el cual se aprecia cartilago maduro (C) y trabéculas de matriz osteoide (H) que rodean fragmentos de médula ósea (MO). H&E, 100x.

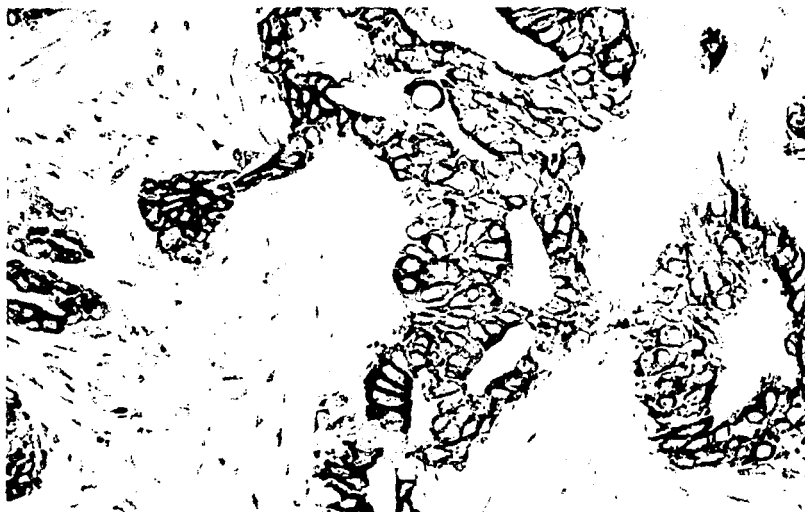


Figura 6. Corte histológico que ejemplifica una reacción fuertemente positiva para Citoqueratina (café oscuro) en las células epiteliales que revisten conductos. 400x.

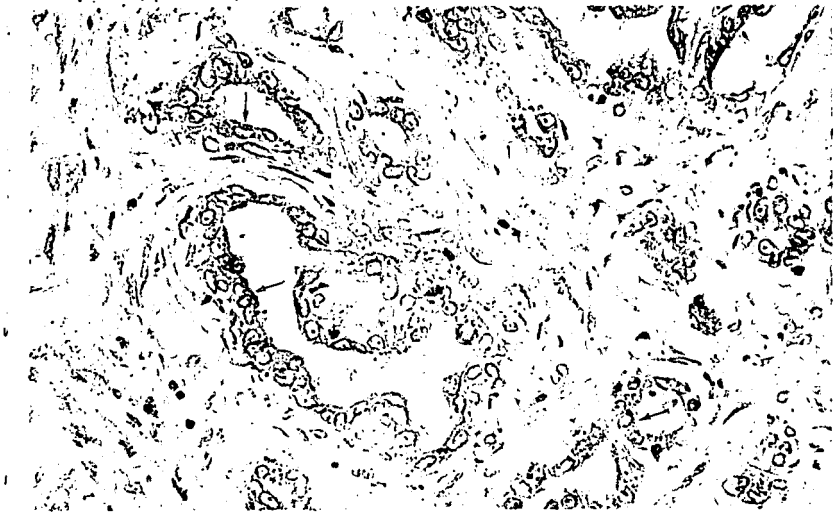


Figura 7. Sección de un área adenomatosa con reacción debilmente positiva para el Antígeno Carcinoembrionario en el epitelio que reviste a los conductos (flechas). Entre éstos se observan células transicionales con la misma reacción. 400x.

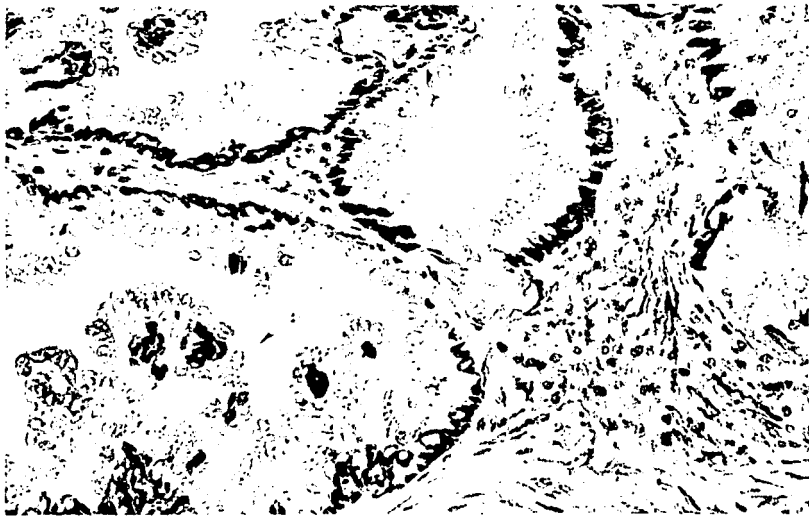


Figura 8. Area adenomatosa que muestra una proliferación de conductos cuyas células epiteliales unidas a la membrana basal, son fuertemente positivas (café oscuro) para Actina Músculo Específica. 400x.

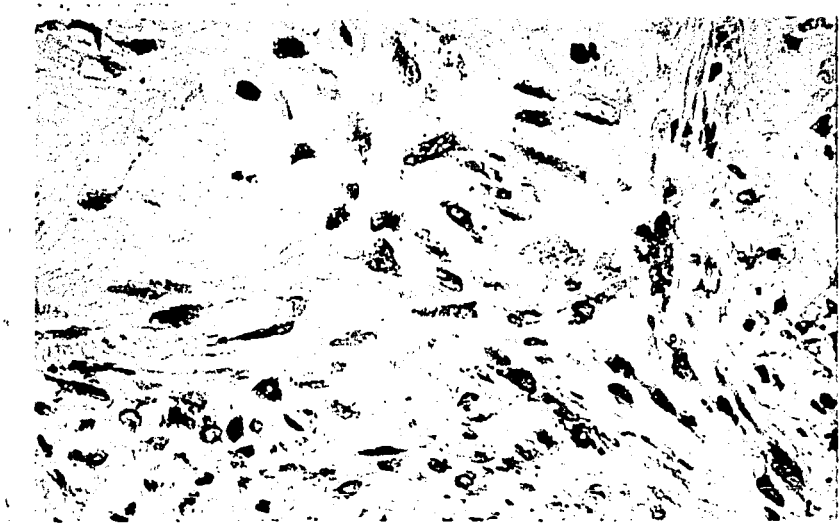


Figura 9. Sección de un área precartilaginosa en la cual se aprecian células transicionales con reacción debilmente positiva para Actina Músculo Específica. 400x.

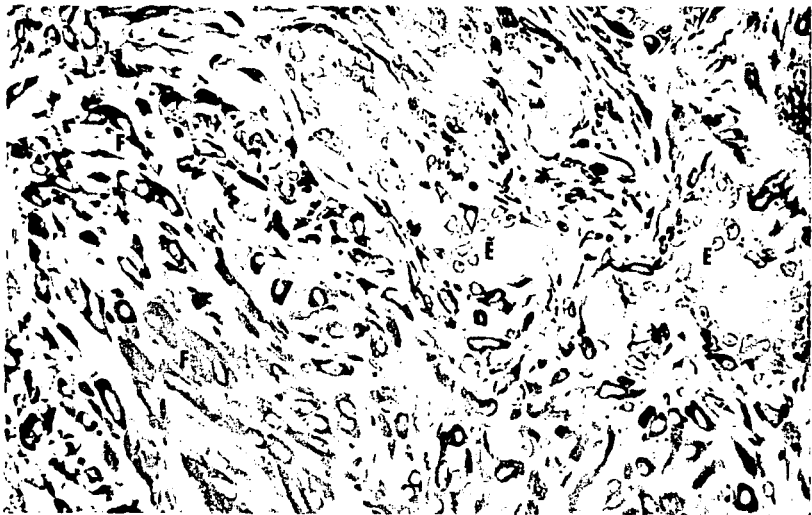


Figura 10. Sección histológica correspondiente a un área mixoide en la cual se observa que las células fusiformes (F) que proliferan, son débil y fuertemente positivas para Vimentina, mientras que el epitelio que reviste a los conductos es dudoso (E). 400x.

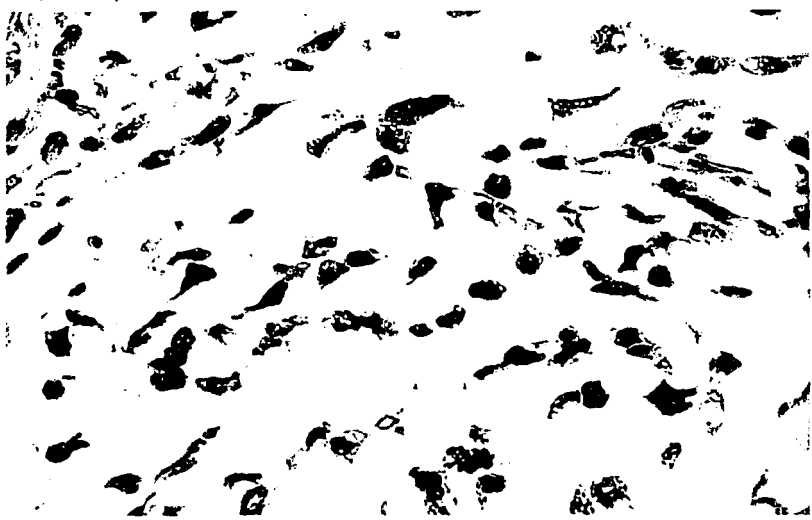


Figura 11. Sección de un área precartilaginosa formada por células alargadas y estelares fuertemente positivas a Vimentina (café oscuro). 400x.

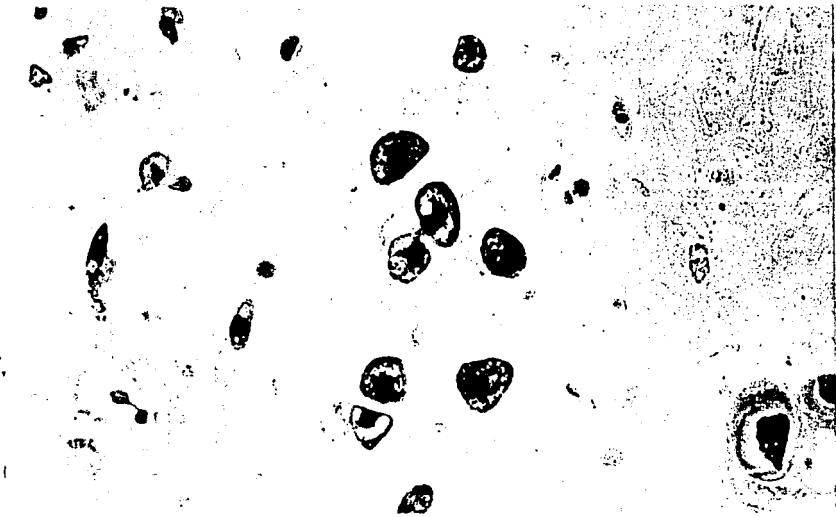


Figura 12. Cartílago maduro cuyas células expresan fuertemente a Vimentina (café oscuro). 400x.

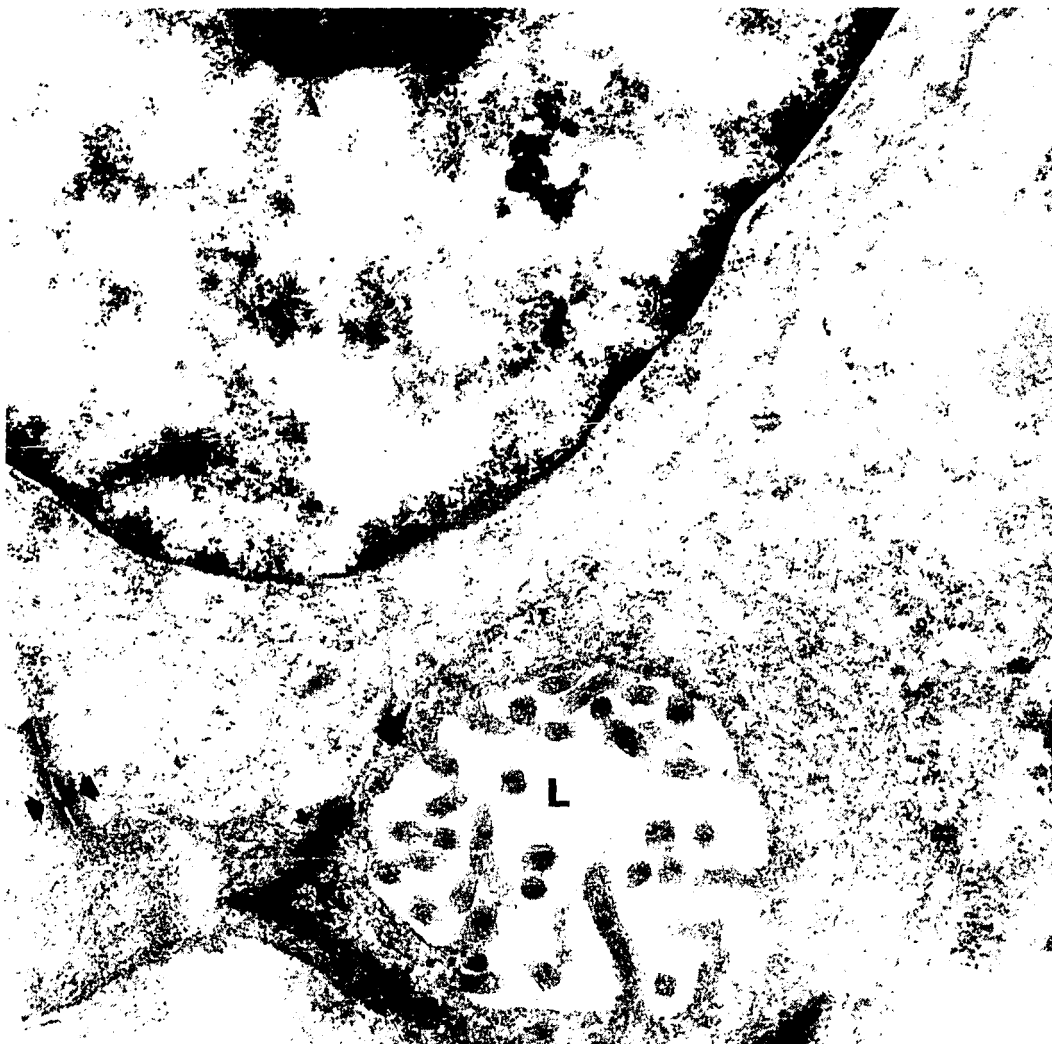


Figura 13. Electromicrografía de una célula epitelial en la cual se observan desmosomas (flechas) y una luz intracelular (L) con microvellosidades proyectadas hacia la misma. 48000x.



Figura 14. Célula mioepitelial que muestra filamentos delgados de 5 a 8 nm (F), cuerpos densos (flechas) y fragmentos de membrana basal (MB) unida por hemidesmosomas (HD). 28000x.

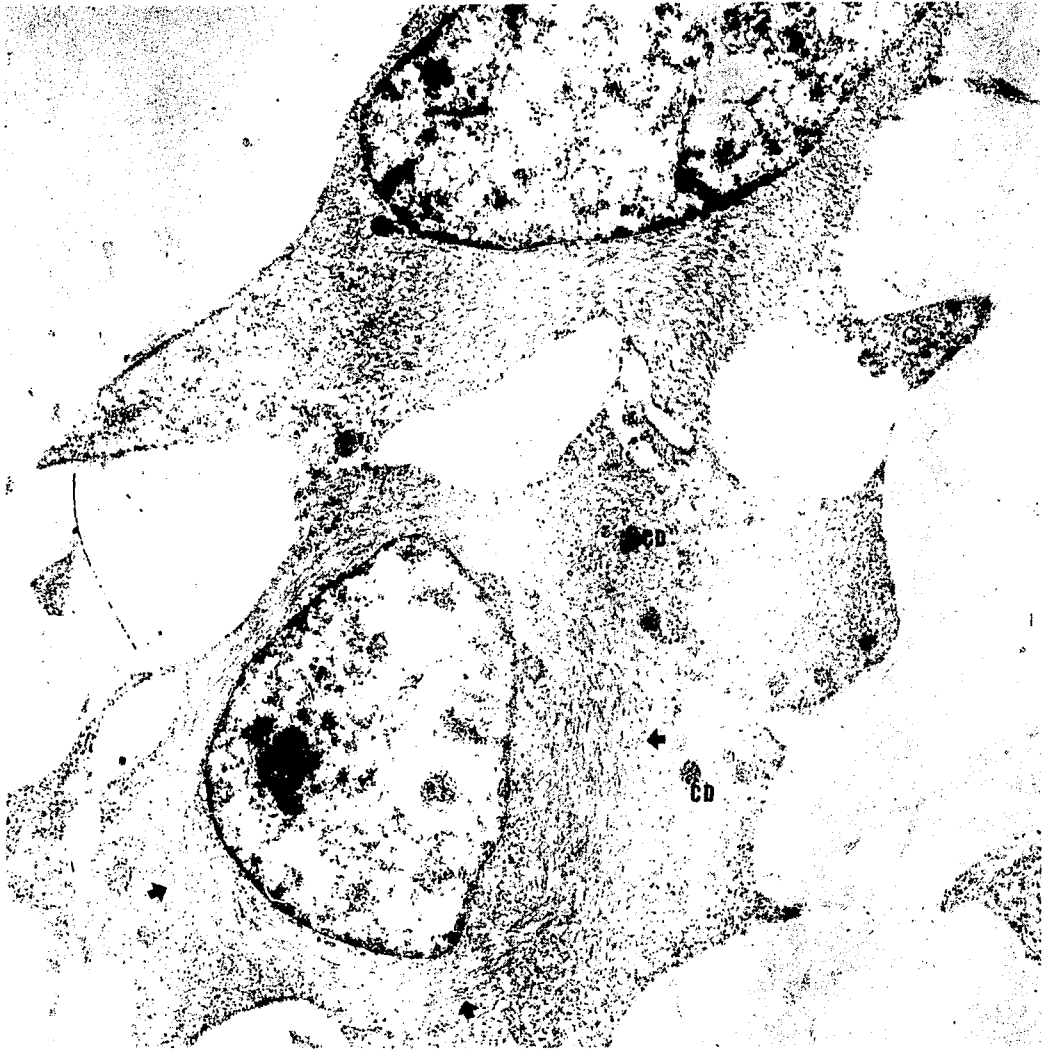


Figura 15. Células filamentosas de contornos irregulares que tienden a aislarse en una matriz mucoide. El citoplasma es electrodensó debido a la gran cantidad de filamentos de 5 a 8 nm orientados predominantemente alrededor del núcleo (flechas). También pueden observarse algunos cuerpos densos (CD). 28000x.

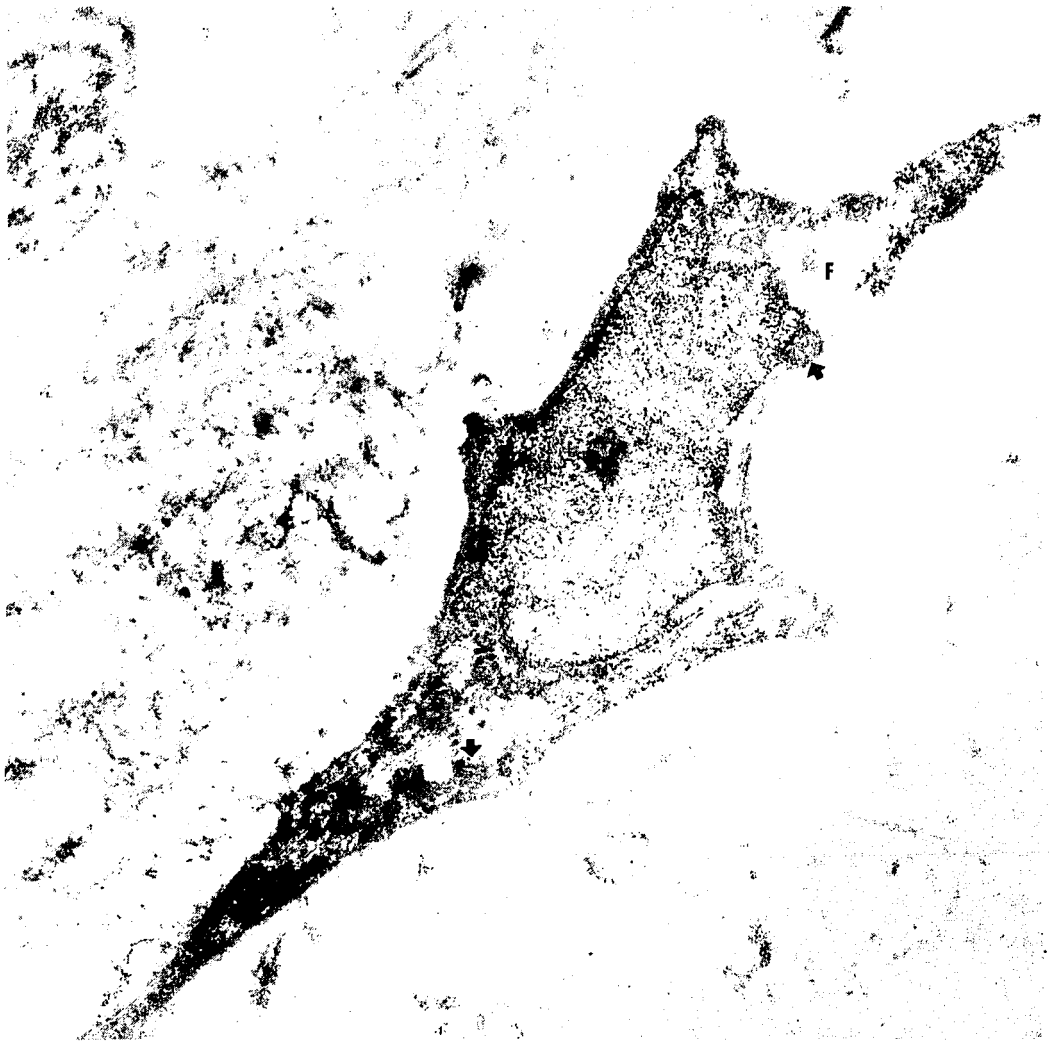


Figura 16. Electromicrografía que muestra una célula estelar inmersa en una matriz intercelular escasamente colagenizada. Nótese la persistencia de filamentos (F) y gránulos electrodensos (flechas) . Estas células se caracterizan por su contorno irregular. 28000x.

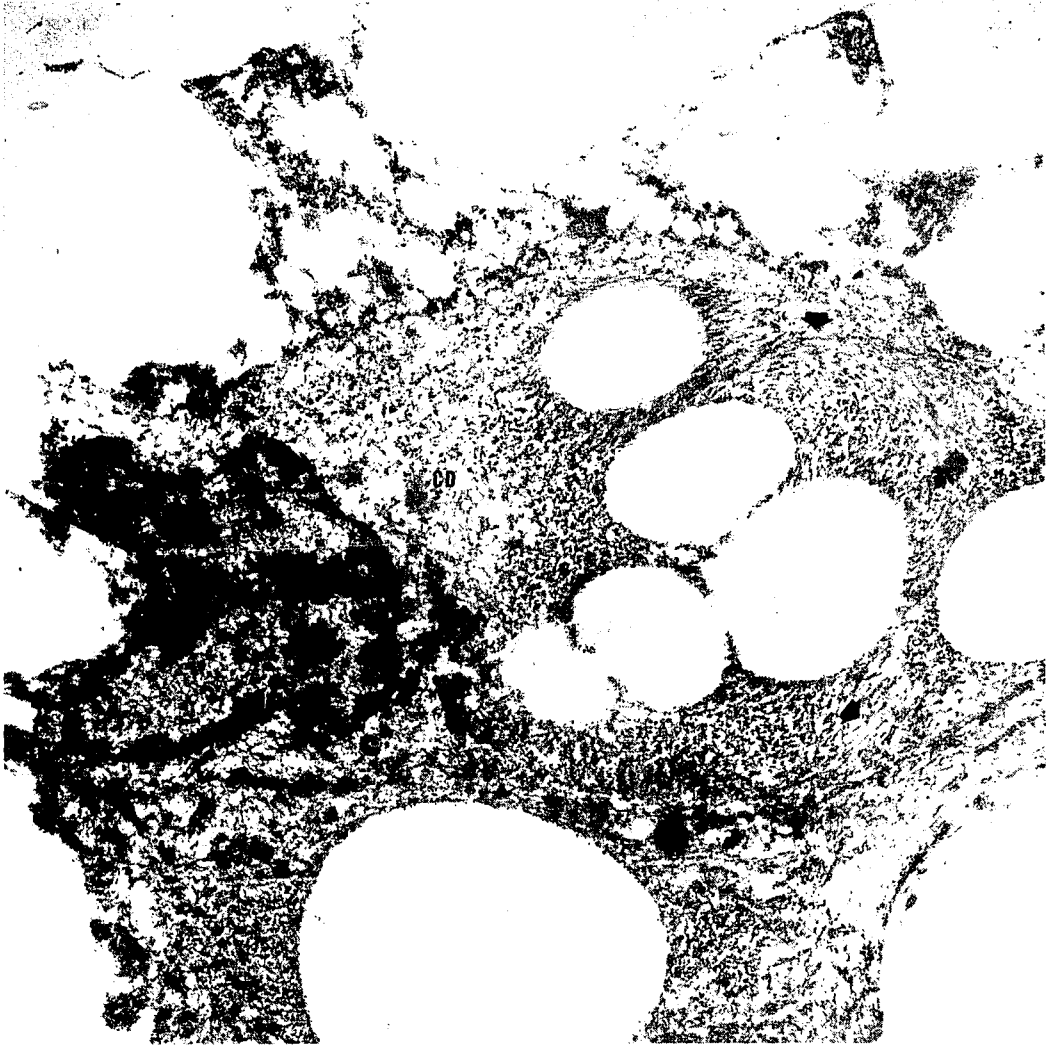


Figura 17. Célula precartilaginosa en la que comienzan a observarse grandes vacuolas en su citoplasma y aún presenta filamentos de diferente grosor (flechas), así como, cuerpos densos (CD). 28000x.

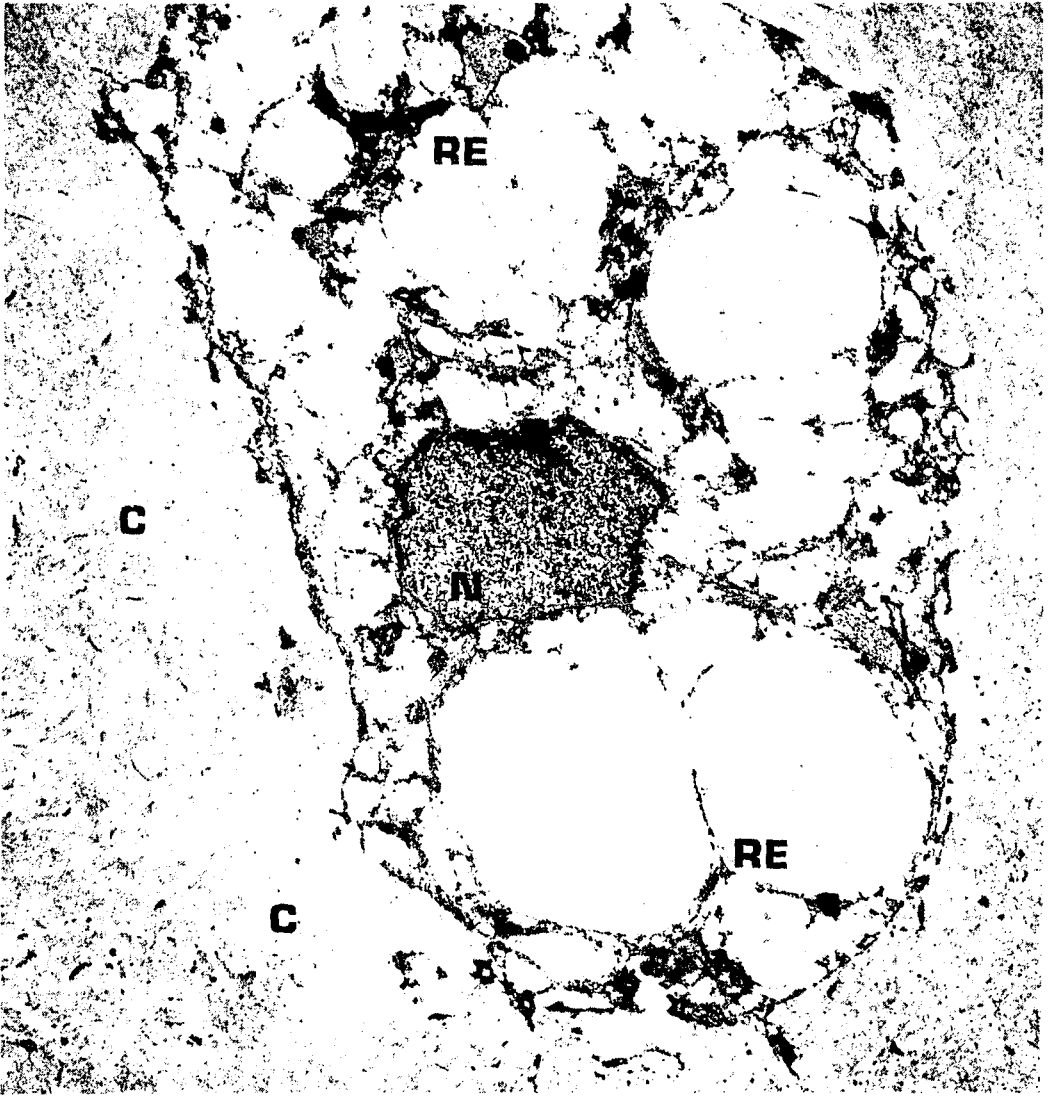


Figura 18. Célula condroide aislada dentro de una matriz cartilaginosa caracterizada por la presencia de fibras de colágena irregulares (C). Dicha célula muestra cambios degenerativos importantes que consisten en la dilatación de cisternas de retículo endoplásmico (RE) y un núcleo electrodenso ligeramente contraído (N). 28000x.