



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

HIF 1-Alfa, Angiogénesis en Carcinoma de Células Escamosas y Mastocitoma en Pequeñas Especies, Inmunohistoquímica, Microarreglos de Tejidos y Análisis Automatizado de Imágenes

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

MVZ OLIVER GAMBOA ADAME

Tutor Principal:

Dr. Gilberto Chávez Gris
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité Tutorial:

Dra. Guillermina J. Baay Guzmán
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Dr. Eduardo García Zepeda
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Agosto 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

I. Dedicatorias

Índice

| | | |
|-------|---|----|
| I. | Título | 6 |
| II. | Resumen | 6 |
| III. | Abstract | 6 |
| IV. | Introducción | 8 |
| | Justificación | 8 |
| | Objetivo | 9 |
| | Objetivos específicos | 9 |
| | Hipótesis | 9 |
| | Antecedentes | 10 |
| | La Piel y sus Características | 10 |
| | Acercamiento Diagnóstico a Problemas Dermatológicos Neoplásicos | 12 |
| | Desarrollo Celular y su Modificación Tumoral | 13 |
| | Características de la Tumorigénesis | 14 |
| | Habilidades de las Células Neoplásicas | |
| | Diferencia de Tumores Benignos y Malignos | |
| | Graduación y Etapa de los Tumores en General | |
| | Angiogénesis como habilidad adquirida del tumor | 16 |
| | Los Tumores Sólidos e Hipoxia | |
| | Importancia del Microambiente Tumoral | |
| | Fenómenos de Hipoxia y Reoxigenación en el Microambiente Tumoral | |
| | Inmunohistoquímica en el Diagnóstico de Neoplasias | 21 |
| | Hypoxia Inducible Factor (HIF) en angiogénesis tumoral | |
| | Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) en angiogénesis tumoral | |
| | Proteína Ki67 como índice de proliferación tumoral | |
| | Cluster of Differentiation 117 (CD117) alteración del receptor en tumores | |
| | Características del Mastocitoma | 27 |
| | Clasificación del mastocitoma | |
| | Inmunohistoquímica en el Estudio de los Mastocitomas | |
| | Características del Carcinoma de Células Escamosas en la Piel | 30 |
| | Clasificación de Carcinoma de Células Escamosas de la Piel | |
| | Inmunohistoquímica en el estudio de Carcinoma de Células Escamosas de la Piel | |
| V. | Materiales y Métodos | 34 |
| | 1. Obtención de muestras | |
| | 2. Biomarcadores | |
| | 3. Técnica de Inmunohistoquímica | |
| | 4. Criterio de gradación | |
| | 5. Análisis estadístico | |
| VI. | Resultados | 37 |
| | 1. Obtención de muestras | |
| | 2. Biomarcadores | |
| | 3. Técnica de Inmunohistoquímica | |
| | 4. Criterio de gradación | |
| | 5. Análisis estadístico | |
| VII. | Discusión | 42 |
| VIII. | Referencias | 48 |
| IX. | Apéndices, Anexos y Gráficas | 55 |

Lista de Cuadros

- Cuadro 1 Enfermedades frecuentes en los perros y gatos.
- Cuadro 2 Casos incluidos en el estudio, perros y gatos.
- Cuadro 3 Comparación de los casos de Mastocitoma canino distribuido según el grado Patnaik y Kiupel.
- Cuadro 4 Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas según el grado.

Lista de Esquemas

- Esquema 1 Capas de la piel.

Lista de Figuras

- Figura 1 Muestras en parafina de los casos de Mastocitoma.
- Figura 2 Bloques de TAM (Microarreglo de Tejidos) reparafinados.
- Figura 3 Imagen digitalizada de los TAM (Microarreglo de Tejidos).
- Figura 4 Laminillas de los TAM (Microarreglo de Tejidos).
- Figura 5 Patrón de las coordenadas de los TAM (Microarreglo de Tejidos).
- Figura 6 Imagen digitalizada de la laminilla de TAM (Microarreglo de Tejidos).
- Figura 7 Carcinoma de Células Escamosas en un paciente felino.
- Figura 8 Mastocitoma Canino.
- Figura 9 Mastocitoma canino, tinción de Hematoxilina Eosina.
- Figura 10 Mastocitoma canino, biomarcador CD117.
- Figura 11 Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcarje HIF1 α positivo de tipo nuclear.
- Figura 12 Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcarje VEGF positivo.
- Figura 13 Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcarje CD117 positivo de tipo citoplasmático.
- Figura 14 Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcarje Ki67 positivo de tipo nuclear.
- Figura 15 Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcarje HIF1 α positivo de tipo nuclear.
- Figura 16 Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcarje VEGF positivo.
- Figura 17 Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcarje CD117 positivo de tipo membranal.
- Figura 18 Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcarje Ki67 positivo de tipo nuclear.
- Figura 19 Gráfico de los casos muestreados en el estudio.
- Figura 20 Distribución de los casos de Mastocitoma por grado según Patnaik.
- Figura 21 Distribución de los casos de Mastocitoma por grado según Kiupel.
- Figura 22 Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas por grado.
- Figura 23 Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas por grado según la especie
- Figura 24 Distribución de los biomarcadores en Mastocitoma según el grado Kiupel.
- Figura 25 Distribución de los biomarcadores en Mastocitoma según el grado Patnaik.
- Figura 26 Mastocitoma según el grado Patnaik, desviaciones estándar.
- Figura 27 Mastocitoma según el grado Kiupel, desviaciones estándar.
- Figura 28 Distribución de los biomarcadores en Carcinoma de Células Escamosas en felinos, según el grado.
- Figura 29 Distribución de los biomarcadores en Carcinoma de Células Escamosas en caninos, según el grado.
- Figura 30 Correlaciones para Mastocitoma según el grado Patnaik I.
- Figura 31 Correlaciones para Mastocitoma según el grado Patnaik II.
- Figura 32 Correlaciones para Mastocitoma según el grado Kiupel bajo.
- Figura 33 Correlaciones para Mastocitoma según el grado Kiupel alto.
- Figura 34 Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en caninos.
- Figura 35 Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en felinos.

| | | |
|----|--|----|
| | Abreviaturas y Siglas Usadas | |
| | Anexo1. Protocolo de Inmunohistoquímica. | 77 |
| X. | <i>Agradecimientos.</i> | 77 |

I. Título

“HIF 1-alfa, angiogénesis en carcinoma de células escamosas y mastocitoma en pequeñas especies, inmunohistoquímica, microarreglos de tejidos y análisis automatizado de imágenes”

II. Resumen

La angiogénesis es necesaria en la generación de un tumor, mantiene el crecimiento, progresión en los cambios y diseminación del tumor. El microambiente rodeando estas células anormales favorece el suministro de factores de crecimiento, mitogénicos y de transcripción, así el potencial de desarrollo celular puede ser alcanzado eficientemente. Se ha demostrado que la participación de factores como HIF1- α (*Hypoxia Inducible Factor 1-alpha*) y VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) en diversos tumores animales y humanos es un marcador de agresividad, baja respuesta al tratamiento y mal pronóstico junto con otros biomarcadores como Ki67 o PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) como determinantes en el proceso tumoral. En el estudio se obtuvieron muestras de 48 pacientes (100%) de estas 19 pacientes con Carcinoma de Células Escamosas (CCE) 68.5% (13/19) fueron perros y 31.5 % (6/19) eran gatos y en el caso de Mastocitoma el total fueron 29 pacientes 60.4% (29/48) todos perros. El total de gatos en el estudio fueron el 12.5% (6/48). Las mayores expresiones se presentaron con HIF1- α membranaral y CD117 membranaral en todos los tumores. Entre las asociaciones más fuertes se mantuvieron los mismos marcadores en ambos tumores. Las expresiones además fueron incrementándose conforme aumentaba la relación al grado histopatológico, asociándose a que la actividad celular y al efecto hipóxico se incrementan conforme el tumor progresa. Se encontró marcaje de HIF-1 α a nivel membranaral en ambos tumores en las dos especies, estos cambios en la localización de la expresión son observados cuando las proteínas han sufrido modificaciones subcelulares, donde esta ubicaciones atípicas son consideradas cambios indicativos de enfermedades como el cáncer.

Palabras Clave (HIF1- α , Mastocitoma, Carcinoma de células de escamosas, Angiogénesis)

III. Abstract

Angiogenesis is fundamental in tumor formation, it keeps growth, progression and tumor dissemination. The microenvironment surrounding these abnormal cells, improves the arrival of growth, mitogenic and transcriptional factors, making that this cells growth potential is achieved efficiently. Factors that influence those changes like HIF1- α and VEGF are seen in different animal and human tumors, and are indicators of aggressiveness, low treatment responses, and worse prognosis, in combination with other biomarkers like Ki67 or PCNA are determinants in tumor progression. This study included samples of 48 patients (100% 48/48), of them 19 were Squamous Cell Carcinoma patients, 68.5% (13/19) were dogs and six of them cats (31.5%) (6/19) the rest and 29 Mast Cell tumor patients 60.4% (29/48), dogs all of them. The total number of cats in the study was 12.5% (6/48). The highest visible expressions were seen in HIF1 α membrane and CD117 membrane biomarkers in all tumors. The strongest associations occurred between those biomarkers also in both tumors. The expressions

kept increasing related to the histopathological grades. The HIF-1 α membrane expression was found in both tumors and species, those abnormal localization in the expression are noted when the proteins suffer changes at subcellular level, and the atypical localization are consider marks of diseases like cancer.

Keywords (HIF1- α , Mast Cell tumor, Squamous cell carcinoma, Angiogenesis)

II. Introducción

Justificación

La importancia del cáncer en mascotas es reconocida, estudios indican prevalencias hasta de 1 de cada 4 perros y 1 de cada 6 gatos que desarrollarán cáncer en el largo de su vida, y aproximadamente un 50% de los pacientes de más de 10 años que morirán de trastornos asociados a este padecimiento (Camilla Kidd, 2008). El mastocitoma y el carcinoma de células escamosas son tumores con alta prevalencia entre perros y gatos, con efectos severos en la salud donde los diagnósticos oportunos podrán proveer mejores pronósticos y atención. (3,4). La regulación de la angiogénesis es la llave para la subsistencia celular tumoral, la hipoxia es frecuente en tumores sólidos con participación de factores como HIF1- α que modifica mecanismos celulares como secreción de citocinas alterando la apoptosis en células endoteliales (Moeller, 2004), el tratamiento directo contra HIF1- α se investiga actualmente y diferentes estudios lo han reconocido como un factor que participa en crecimiento tumoral, angiogénesis, invasión y metástasis tumoral (Georgina N. Masoud, Wei Li, 2015), la metástasis es un factor para morbilidades y mortalidades en el orden del 90% de los tumores en humanos (Xiangming Guan, 2015). La hipoxia permite el desarrollo de resistencia al tratamiento antineoplásico ya que estos cambios hipóxicos provocan resistencia a la radiación ionizante al dificultar una adecuada peroxidación del DNA, ante un ambiente ácido se propaga un fenotipo celular agresivo propenso a la angiogénesis, invasión y metástasis, mediado por factores como HIF1- α y este a su vez es un factor de transcripción para otros genes como VEGF (27). En los tumores la secreción y producción de VEGF-A se puede generar de manera excesiva en las células endoteliales con un crecimiento vascular en tipo de brote, por lo que la vasculatura desarrollada se esparce con un crecimiento en punta y de manera descontrolada, ésta presencia de VEGF se asocia de igual manera a pobre respuesta a tratamientos y mayor riesgo a metástasis. En el caso de c-kit, se han encontrado cambios en la expresión y alteración del receptor de tirosin kinasa c-kit asociándose estos en casos más indiferenciados a metástasis en diferentes tumores con rangos desde un 55 a 96%, e iniciándose una invasión local y a linfonodos regionales y posteriormente hacia bazo e hígado. La proliferación de las células tumorales se ha estudiado con el biomarcador Ki67 que al estar expresado en rangos de 15 a 30% logra evidenciar un factor desfavorable en tumores en animales y humanos. La hipoxia en tumores como el CCE en humanos, está asociada a pobre pronóstico (Chou, et al 2004), el estudio de vías que afectan esta condición y su tratamiento ha ido en aumento en tumores en medicina para humanos, razón por lo cual es importante conocer su comportamiento en tumores de perros y gatos, donde los efectos tumorales pueden llegar a ser devastadores.

Objetivo

Evaluar la expresión de HIF-1 α en carcinoma de células escamosas y en mastocitoma, y su participación en la angiogénesis a través de estudios de inmunohistoquímica, mediante microarreglo de tejidos y el análisis automatizado de imágenes, en biopsias de perros y gatos remitidas a la USEDICO, CEIEPAA de la FMVZ, UNAM, en el período comprendido de 2008 al 2016 .

Objetivos específicos

1. Detectar mediante inmunohistoquímica la expresión de HIF-1 α , Ki67, VEGF y CD117 en Mastocitoma canino.
2. Detectar mediante inmunohistoquímica la expresión de HIF-1 α , Ki67, VEGF en Carcinoma de Células Escamosas de piel de perros y gatos.
3. Evaluar mediante análisis automatizado de imágenes la expresión de HIF-1 α y VEGF en la participación de hipoxia y angiogénesis en en Mastocitoma canino y Carcinoma de Células Escamosas de piel de perros y gatos.
4. Evaluar mediante análisis automatizado de imágenes la expresión de Ki67 y CD117 como actividad celular en Mastocitoma y Carcinoma de Células Escamosas de piel en perros y gatos.

Hipótesis

La expresión de los biomarcadores de angiogénesis HIF 1- α y VEGF están asociadas a un microambiente tumoral con mayor actividad de células neoplásicas indicadas mediante Ki67 y CD117 en Carcinoma de Células Escamosas y Mastocitoma de piel en perros y gatos.

Antecedentes

Se estima que un 25% de los casos en la clínica en pequeñas especies involucran a enfermedades dermatológicas, siendo los tumores una afección relevante, (Hill PB, et al 2006, Javad Khoshnegah, 2013) (*Cuadro 1 Enfermedades*). Del total de tumores cutáneos, el mastocitoma presenta una frecuencia entre 7 a 21% en caninos (Bostock, 1986, Rothwell, 1987) y en un estudio en gatos lo ubicaron en 21% (Miller M.A. 1991) y otros autores entre 2 y 15 % (Buerger 1987, Molander-MacCray et al 1988), y el carcinoma de células escamosas un 15- 49% (Burrows et al. 1994, Goldschmidt, 1992, Miller et al. 1991) en felinos y un 5-20% en caninos (Bevier y Goldschmidt, 1981, Goldschmidt y Shofer, 1992) o en 15 % (Miller et al, 1991). Estos tumores presentan procesos inflamatorios activos y angiogénesis. (1,2,3,32,33) La angiogénesis es un paso fundamental en la generación de un tumor, y consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio existente, de esta manera es posible que mantenga un crecimiento, una progresión en los cambios en la vasculatura con desarrollo de nuevos vasos y crecimiento de los vasos existentes y la posibilidad de diseminación. El microambiente que rodea a este conjunto de células anormales favorece el suministro de factores de crecimiento, factores mitogénicos y de transcripción, con lo cual el potencial de desarrollo de este tipo de células puede ser alcanzado de una manera más eficiente al promover el movimiento por el ciclo celular, tales como la familia de los *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) regulando a factores como Elk-1, jun, fos o la fosforilación de la proteína Rb (*retinoblastoma*) y factores de crecimiento que activan vías del *mammalian target of rapamycin* (mTor), auxiliando en la regulación del crecimiento celular, proliferación, supervivencia, etc. (Fingar D, 2004) Los tumores sólidos presentan áreas dentro de su tejido tumoral, zonas que fluctúan con periodos de ausencia de oxígeno sea por hipoxia aguda o por hipoxia por perfusión limitada, modificando su metabolismo energético y la estimulación de factores de transcripción como HIF-1 α (33-47)

La Piel y sus Características

La piel es el órgano más grande del cuerpo y posee múltiples funciones, es la primer barrera del cuerpo, donde el estrato córneo, aporta defensa directa contra lesiones físicas, desecación e infecciones y junto con los demás estratos están involucradas funciones de inmunorregulación, recepción sensorial, con la grasa subcutánea de termorregulación, entre otras. Esencialmente la piel de los animales es un tejido viscoelástico no homogéneo con características mixtas de fluido viscoso y sólido elástico. (2,3,8)

Las capas de la piel incluyen el epitelio estratificado o epidermis y un tejido conectivo dérmico más profundo o corium. La epidermis es de origen ectodérmico, mientras la dermis proviene del mesénquima que se origina del mesodermo. La epidermis presenta una alta actividad mitótica asociada debida a esta gran diversidad de funciones, la zona de la epidermis se conforma de tres grandes capas, siendo la más profunda el estrato cilíndrico o *stratum basale*, después el estrato espinoso o *stratum malpighii* formando estas dos primeras el

stratum germinale y finalmente el estrato córneo. Los melanocitos se ubican en el estrato cilíndrico y en la parte más profunda del estrato espinoso. La epidermis es generalmente más gruesa en áreas que no presentan una gran cantidad de pelo. La dermis o *corium* está compuesta de fibras de colágeno, reticulares y elásticas que están dentro de una sustancia de mucopolisacáridos compuesta de ácido hialurónico y ácido de condroitin sulfato, representando aproximadamente un 90% de la dermis. Los fibroblastos, macrófagos, células plasmáticas y mastocitos están distribuidos por toda la dermis, teniendo mayor proporción en la zona más superficial. La dermis en el perro y gato se subdivide en el estrato papilar superficial y en el estrato reticular profundo. La hipodermis o subcutis está asociado a la dermis y se compone básicamente de grasa con fibras de colágeno trabecular y fibras elásticas y se involucra con el correcto funcionamiento de la piel. Se divide en el estrato adiposo subcutáneo y el estrato fibroso subcutáneo profundo. (2,3,6,8) (*Esquema 1 Capas de la Piel*)

En los estratos de la piel tenemos que considerar a los componentes involucrados, denominados en su conjunto anexos cutáneos dentro los cuales están los folículos pilosos, las glándulas sudoríparas y las glándulas sebáceas. Otras estructuras glandulares cutáneas incluyen las glándulas mamarias, las glándulas del dorso de la cola, los sacos anales, las glándulas circumanales, todas de origen ectodérmico. Debido a sus características de función y a su gran diversidad celular, muchos estímulos contribuyen a la alteración de los diferentes estratos y tipos celulares, desde la radiación UV, desequilibrios nutricionales y hormonales, reacciones de índole inmunomediado y muchas otras, por lo cual la diversidad de patologías que podemos llegar a encontrar es amplia y se establece un conflicto en el momento de ofrecer un diagnóstico preciso con un único método. La piel es un tejido que presenta características muy especiales como la formación de cubiertas cornificadas en la etapa final de la diferenciación de queratinocitos, los cambios permiten que se vuelvan más permeables a iones como Ca^{++} que cataliza por transglutaminasas la formación de la cubierta en el queratinocito. Sucede una actividad particular donde la vía de las caspasas que regula la muerte celular es la encargada del proceso de diferenciación, siendo la caspasa 14 la proteína encargada de que los queratinocitos embrionarios sean modificados y posteriormente llevados de la etapa de proliferación hasta la diferenciación final, considerándose un fenómeno similar a la apoptosis pero que en terminaran en la cornificación de los queratinocitos. En sí las caspasas apoptóticas 3, 6 y 7 no se consideran activas en la cornificación de los queratinocitos. (24,25)

La piel se considera un tejido expuesto a mínima concentración de oxígeno, siendo la epidermis un compartimento avascular con una dermis vascularizada, pero considerándose en un estado de adormecimiento (Detmar 1996) con la capacidad de iniciar una neovascularización transitoria ante estímulos epiteliales ya sea patógenos o lesiones como heridas, este microambiente facilita respuestas angiogénicas en respuestas inflamatorias, que provee mayor flujo de sangre, permeabilidad vascular y extravasación de células como leucocitos, macrófagos y mastocitos que son productores de citocinas y participan por ejemplo en el proceso de angiogénesis al proveer de esta forma factores de crecimiento y además la modificación extracelular por

proteólisis localizada (Roitt et al., 1988). La neovascularización requiere de factores de crecimiento y además la modificación extracelular por proteólisis donde los mastocitos ayudan como uno de los principales auxiliares angiogénicos. (3,8,9) Estos mastocitos por ser células inflamatorias juegan un papel preponderante en el mantenimiento de la reparación y ante ciertos estímulos anómalos mantienen un efecto proactivo. Los mastocitos al activarse en la inflamación aguda liberan y generan mediadores de inflamación tales como heparina, heparinasa, histamina (Yong, 1997). Además se ha demostrado que existe una correlación entre la densidad de mastocitos en el tejido conectivo y la presencia de vasos sanguíneos (Eady et al. 1979). La activación y degranulación en el tejido conectivo se asocia a su degradación alrededor de sitios neovascularizados (Dabbous et al. 1986).

Acercamiento Diagnóstico a Problemas Dermatológicos Neoplásicos

El diagnóstico dermatológico se basa en citología, aspiración con aguja fina, impresión directa, tinciones, raspados, lámpara de Wood, cultivo, tricogramas, pruebas serológicas y biopsias. Las indicaciones para biopsia incluyen lesiones inusuales, no responsivas a tratamientos, resultados de estudios poco específicos o nulos, confirmación histopatológica para realizar tratamientos y para descartar otros diagnósticos.(8,20)

El diagnóstico de tumores por histopatología se basa en las características morfológicas de los tejidos y células. La mayoría de los tumores son clasificados mediante tinciones histológicas de rutina aplicados a corte de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina que pueden ser usados después para otras técnicas como el microarreglo de tejidos (*Figura 1*). Un alto porcentaje de biopsias pueden ser diagnosticadas vía tinciones como hematoxilina-eosina, Ziehl-Neelsen, PAS, tricrómica de Masson, etc. En el 10% restante para poder identificar tumores de difícil clasificación, anaplásicos, pleomorfos, de células pequeñas, carcinomas indiferenciados o metástasis de origen incierto, se requiere el uso de inmunohistoquímica, microscopia electrónica, citometría de flujo u otras técnicas moleculares y tinciones. (7,8,9,10)

Existen técnicas para el manejo de las muestras donde puede haber ya sea múltiples muestras o múltiples reactivos a aplicar, como el arreglo de tejidos o el microarreglo de tejidos (TAMs) en parafina. (*Figura 2*). Ésta modalidad es de uso reciente en la patología, naciendo de la necesidad de los investigadores a técnicas moleculares que les permitiera más eficientemente la examinación en la expresión génica. De esta manera se pueden posteriormente realizar análisis a mayor escala con alguna de las técnicas como inmunohistoquímica (IHQ) o hibridación *in situ* (FISH) entre otras, con mejor costo-beneficio y más rápido. (*Figuras 3 y 4*). En los microarreglos de tejido (TAM) se recolocan muestras biológicas desde un bloque de parafina donante de un área previamente seleccionada obteniéndose pequeñas muestras histológicas cilíndricas de tejidos especiales o tumores, estas son colocadas en un nuevo bloque y son desparafinadas y reparafinadas para que estén

todas ellas en un mismo recipiente manteniéndose un patrón de coordenadas para la correcta ubicación posterior. (Figuras 5 y 6).

La cantidad de muestras que pueden ser colocadas varía dependiendo el instrumento que se utilice para su colecta como un sacabocado dermatológico donde se obtienen muestras de de 1 a 4 mm o pudiendo ser tan pequeños con 0.6 mm de diámetro con lo cual se obtienen 0.282 m² de área a examinar o dos a tres campos de visión de poder, de esta manera pueden colocarse hasta 600 muestras por bloque.

Entre las ventajas más destacadas se tiene el uso ampliado de un recursos limitado, el análisis simultáneo de un número grande de muestras, posibilidad de uniformidad experimental ante las variabilidades que se puedan presentar en las técnicas aplicadas a las muestras, disminuye el volumen de la zona muestral y con ello el costo y tiempo, evita la destrucción de los bloques originales para su utilización posterior y aunque no está exenta de algunas desventajas como la posibilidad de afectar la representatividad de los resultados, estos se corrigen al efectuar una correcta valoración y selección previa de las zonas a muestrear y en diferentes estudios se ha podido demostrar que con la correcta adquisición de las muestras esta técnica sigue siendo representativa cuando se compara con biopsias completas (Parker RL, et al. 2002, Camp RL 2000, Nocito A. et al. 2001) (73,74) (Figuras 3 y 4)

El análisis de los arreglos o microarreglos de tejidos (TAM) es implementado por el uso de programas y equipos que utilizan algún sistema automatizado para la identificación y estandarización como por ejemplo Hamamatsu®, Olympus®, Omnyx®, Aperio ImageScope®, o DigiPath®, estos programas nos permiten tener una microscopia virtual que busca emular la iluminación convencional a través de programas computacionales, y es llevado a cabo a través de dos procesos, el primero utiliza un escáner para digitalizar las imágenes de las laminillas tradicionales, obteniendo entonces una nueva laminilla digital donde posteriormente se procesan como segundo paso estas imágenes con algún programa para ver o analizar dichos archivos. Para los análisis se utilizan algoritmos sobre las imágenes previamente digitalizadas para tratar de identificar cuanto marcaje existe, donde está ese marcaje y cuantas estructuras están siendo marcadas o cual es la diferencia entre la cantidad de marcaje entre las diferentes estructuras celulares. La revisión de las laminillas puede observarse desde los 2x, 4x, 20x, 40x y por ejemplo en equipos como el Aperio ImageScope® hasta 63x. (Navid Farahani, et al. 2015) (Figuras 6 y 7)

Desarrollo Celular y su Modificación Tumoral

El desarrollo de la piel y otros tejidos se forman a través de una maduración celular donde se involucran la división celular, la proliferación y la diferenciación bajo un estricto control donde debe existir un balance entre muerte y división, si esta homeostasis se pierde pueden darse mecanismos de proliferación descontrolada o fallas en la muerte celular. Las células tienen un determinado lapso de vida dependiendo del tejido, por lo cual la

reproducción celular es necesaria para mantener un individuo sano; los mecanismos que rigen el proceso secuencial son la mitosis (núcleo) y la citoquinesis (citoplasma), encargadas de mantener a las células somáticas en control. Estas secuencias dentro de la división celular varían dependiendo del tipo celular (proliferativas o no proliferativas). Hay cuatro fases de la división celular, G1 (Activación mitogénica), S (síntesis DNA), G2 y M (mitosis), se considera a una más llamada G0 o arresto del ciclo, donde se encuentran la mayoría de las células de un organismo. La interfase o la parte de la duplicación del material genético involucra a G1, G2 y S. Dentro de estos procesos ciertas proteínas llamadas ciclinas y otras cinasas ciclino dependientes o CDK (cyclin-dependent kinases) que regulan una serie de puntos de control críticos que median señales mitogénicas o inhibitorias para que el ciclo pueda ser completado o sea interrumpido.(3,4)

Los tejidos formados por división celular, proliferación y diferenciación ante estímulos nocivos epigenéticos o genéticos, donde se conoce a los epigenéticos como los que modifican la expresión de los genes sin afectar la secuencia de DNA lo cual provoca una alteración fenotípica como sucede en la depleción de oxígeno, o los estímulos genéticos como los que sí alteran la secuencia del DNA, sin embargo, en ambos casos se podrá iniciar una vía de control de estos daños como la apoptosis o arresto del ciclo de división celular siempre y cuando los puntos de control estén funcionales. Ante ciertos estímulos cuando no es posible la reparación celular entrarán en apoptosis o mecanismos de muerte celular controlada por lo que se genera una reducción de la célula y el núcleo, y posteriormente la fragmentación y fagocitosis, donde la muerte celular presenta la diferencia en la necrosis en la cual se genera una lisis y edematización celular.(3,4,5)

De manera normal los mecanismos de los puntos de control en cada parte del ciclo reconocen y reaccionan a estímulos anormales, en G1 responderán al daño al DNA, en S monitorean la calidad de la replicación y el daño al DNA y en la G2/M verifican el estado de las fibras. Si existe falla en alguno de los puntos de control del ciclo celular se provocará la proliferación descontrolada o la ausencia de muerte celular, creándose estos fenotipos aberrantes o neoplásicos.(3,4,5) . Entre estos mecanismos se encuentran varias proteínas involucradas en alguna parte del ciclo, por ejemplo la p53 que es considerada un controlador o guardián de la estabilidad genómica y se reconoce como gen supresor tumoral, presentándose como regulador de la transcripción de genes que coordinan la actividad de arresto en etapa G1, reparación del DNA y apoptosis (Jacks y Weinberg, 1996).

Características de la Tumorigénesis

Habilidades de las Células Neoplásicas

Existen varios pasos en este proceso del desarrollo de un tumor o tumorigénesis, y es que al tener un crecimiento multietapa en la formación del tejido a través de cambios en las líneas celulares, es necesario sean sobrepasadas las barreras naturales, se presume que en las alteraciones genotípicas suceden al menos diez

cambios en la fisiología celular que indican un crecimiento con propensión a la malignidad, estas alteraciones son habilidades del tejido neoplásico que modifican el entorno y a sí mismo para lograr su ventaja en el tejido inicial y promueven su continuidad, e incluyen al crecimiento autosuficiente, a la falta de reactividad a señales de inhibición del crecimiento, a la evasión de la apoptosis, al potencial de replicación ilimitada, a la angiogénesis sostenida, a la metástasis e invasión, a la inestabilidad genómica, a la inflamación promovida por el tejido neoplásico, a la alteración en su metabolismo energético y a la evasión del sistema inmune. Todo esto impide una homeostasis en el ciclo celular.(4,5,6,7,8,9)

Muchos de estos procesos ocurren de manera sostenida y simultánea activando varias vías o patrones de información que confluyen en la célula y el entorno. Podría definirse al cáncer como una serie de cambios fenotípicos por eventos genéticos y epigenéticos a través del tiempo. Si bien no existe una definición absoluta del término cáncer, se considera que los tumores contienen tejidos neoplásicos formados de células con crecimiento aberrante y fuera de control que generan entonces ese tejido tumoral. Este proceso anormal mantiene la proliferación y crecimiento celular. (8)

Diferencia de Tumores Benignos y Malignos

Los tumores se pueden clasificar como benignos cuando crecen en cualquier tejido de forma local, generando presión, obstrucción invasión de espacio, pero sin presentar un crecimiento a distancia o metástasis, aunque esto siempre debe considerarse con reservas y dependiente de la localización. *In situ*, que son de origen epitelial, donde histológicamente la lesión contiene células neoplásicas, pero que no invaden la membrana basal o el tejido de soporte mesenquimal. Los tumores malignos a su vez no solo presentan invasión del área local, sino que contienen mecanismos que les permiten la diseminación a distancia del área primaria o metástasis, donde al llegar a estos nuevos lugares, invadirán y proliferarán en los tejidos alcanzados (3,4,5). Es más frecuente observar que los tumores malignos presentan cambios con la tendencia a tener reacciones mucho más severas con procesos inflamatorios persistentes que alteran de forma importante su entorno y principalmente el microambiente tumoral y además suelen generar un efecto de angiogénesis más intenso. (32,33)

Gradación y Etapa de los Tumores en General

En el proceso de la especificación de los tumores, se debe establecer un criterio para determinar el avance del tumor dentro del organismo y con ello ubicar la fase que se trate tanto local como de forma sistémica. Esta gradación se va realizando desde diferentes perspectivas iniciando con el patólogo que dará el grado según las características que contenga las células y la arquitectura del tejido, en la biopsia se determinará la actividad mitótica, esta puede ser revisada vía cuenta de mitosis total o por índices mitóticos la cual se realiza de manera

sistemática contabilizando las mitosis en 10 campos en un objetivo de 40x, la última es la más aceptada como conteo real, sin embargo estos conteos varían dependiendo las área del tumor seleccionadas, si existe necrosis en la zona y el grado de inflamación asociada. Por otro lado se describen los patrones de crecimiento y el grado de invasión del tejido neoplásico en su entorno. (4,8,29)

Las células encontradas en el tejido cambian dependiendo de estos factores, por lo cual la variabilidad celular genera que entre los patólogos se tengan diferentes aproximaciones y clasificaciones en los diferentes tumores. Unas graduaciones cuantifican según la descripción celular que puede ir desde baja, mediana o alta, algunos otros establecen ecuaciones de los cambios encontrados que sean relevantes para obtener algún valor numérico y den un grado. El propósito de todas, es poder ofrecer datos que establezcan la probabilidad de que la neoplasia sea de tipo agresivo, con mayor o menor posibilidad de invasión local o a distancia. La descripción del entorno también ofrece detalles que permiten plantear el mejor acercamiento clínico a cada paciente. Una vez determinado el tipo de tumor y sus características, es momento de establecer la etapa clínico biológica en que se encuentra la relación tumor-paciente, donde se identifica la localización, el tamaño y la implicación linfática. (4,29)

Las neoplasias son consideradas procesos con cambios constantes, con los métodos de gradación como determinaciones en un punto específico de la o las patologías, además hay que tomar en cuenta que los cambios observados están sujetos a la idiosincrasia del paciente y el momento individual de la o las patologías, es por ello importante interpretar el progreso de la enfermedad de forma subjetiva al estar sujeta a la observación del segmento o segmentos del tumor que fueron previamente seleccionados para dichos estudios, agregando un paso previo el cual es la selección de la zona de la recolecta en el paciente, y ello aumenta la variabilidad de los resultados, estos factores pueden tener un impacto negativo si no fueron utilizadas las zonas más representativas. De alguna manera la especificación del grado y etapa funcionan como un determinante del comportamiento predictivo del tumor y las diversas clasificaciones deben utilizarse acorde a cada estirpe del tumor, especie y raza. (3,4,5)

Angiogénesis Como Habilidad Adquirida del Tumor

La angiogénesis es un paso fundamental en la generación de un tumor, y consiste en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del endotelio existente, de esta manera es posible que mantenga un crecimiento, una progresión en los cambios dentro de la zona tumoral con mejora en la irrigación para la masa tumoral por mayor vasculatura en su entorno y dentro de la misma, también con ello aumenta la posibilidad de diseminación posterior. El microambiente que rodea a este conjunto de células anormales favorece el suministro de factores de crecimiento, factores mitogénicos y de transcripción, con lo cual el potencial de desarrollo de este tipo de células puede ser alcanzado de una manera más eficiente. Los tumores sólidos mantienen zonas con

depravación de oxígeno, provocadas por hipoxia aguda o por perfusión limitada, alteraciones que requieren una modificación en su metabolismo energético y la subsecuente estimulación de factores de transcripción como HIF-1. (33-47) Es además un proceso coordinado por una expresión génica alta donde el factor HIF-1 α reacciona como iniciador ante poco oxígeno, influenciada por células inflamatorias, como los mastocitos que influyen en el tumor y vasos sanguíneos, así como los elementos de respuesta a hipoxia de las células endoteliales, su arreglo y neovascularización, a través de la generación de VEGF. Estos cambios permiten el mantenimiento de un tumor al estar íntimamente relacionado con su capacidad de sobrevivencia y crecimiento a través de estos procesos y su posible metástasis, al influir en el metabolismo celular. (Hyun-Ja Jeong, Hyun-A Oh, Sun-Young Nam, 2012) (39,42,47)

Se sabe que es un proceso regulado por un variedad de estímulos con efectos tanto estimulante como inhibitorios. Los estimulantes son amplios y se identifican ciertos atributos entre los que destacan los efectos específicos en las células endoteliales, la presencia de receptores en células endoteliales y la neutralización de factores inhibitorios de angiogénesis (Grunstein et al., 1999; McMahon2000; Sobczyńska-Rak 2012). De manera fisiológica es un proceso necesario que sucede continuamente como es en el caso de la cicatrización, donde las señales proangiogénicas pueden regularse, estos activadores de angiogénesis almacenados son liberados por degranulación o por células inflamatorias de tal forma que se evita la necesidad de inducción de genes transcripcionales, proceso que se altera en la transformación neoplásica. (48,49)

Los Tumores Sólidos e Hipoxia

Los tumores sólidos ante el fenómeno de crecimiento y desarrollo provocan que ciertos sectores dentro del mismo disminuya el oxígeno por periodos largos, ésta hipoxia tisular puede iniciar en rangos desde 0 % hasta un 19% siendo más intenso cuando los valores quedan menores al 1-2% (Jiang et al. 1996, Berra 2003), esto sucede gracias a que en la mayoría de las masas tumorales se puede presentar que la angiogénesis en estos tumores sea de forma aberrante por la pobre aportación arteriolar, por la baja densidad de vasos sanguíneos y por la ineficiente orientación de los microvasos, lo cual provoca que se modifique su metabolismo energético y genere la estimulación de factores de transcripción como lo es el HIF-1 α , que es capaz de coordinar la expresión génica y funcionar como un iniciador ante la respuesta a un ambiente pobre en oxígeno, facilitando la generación de moléculas para el desarrollo del tumor, vasos sanguíneos, así como los elementos de respuesta a hipoxia de las células endoteliales, donde el arreglo vascular y neovascularización se lleva a cabo por la generación de VEGF. Sin embargo esta reoxigenación en las células neoplásicas tras la activación de la angiogénesis provoca un estado de daño por reperfusión o estrés oxidativo que implica la intervención cíclica del sistema óxido-reducción y con ello se den etapas de presencia y ausencia de oxígeno generando por tanto esta angiogénesis aberrante (Dewhirst MW, 1999). Las células tumorales controlan el fenotipo angiogénico, donde la hipoxia es un fenómeno recurrente en el microambiente inflamatorio y neoplásico, que es mediado por

diferentes citocinas para que los cambios permitan el mantenimiento del tumor, pues se reconoce está íntimamente relacionado con su capacidad de sobrevivencia, crecimiento y su posible metástasis, al tener estas células tumorales la capacidad de alterar su metabolismo con el uso de lactato como vía energética, que se ha visto que funciona también como promotor de HIF.(33-47) (13,21)

En los tumores sólidos es común que se modifique el balance celular óxido reducción y entonces se agrava el estrés oxidativo, de tal forma que se ve en la necesidad de regular la transcripción génica, y se desatan las especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*) ROS y de nitrógeno (*reactive nitrogen species*) RNS, que actúan como mensajeros en el ciclo inflamatorio, modificando a ciertos factores de transcripción como lo son el factor nuclear κ B (NF- κ B), la proteína activada (AP-1) y al factor inducido por hipoxia 1α (HIF- 1α). Si éste estrés oxidativo se mantiene, por lo general desencadenará la regulación positiva de la inflamación, aumentando entonces la nueva transcripción de factores que modifican esa función genética. HIF- 1α es considerado además un regulador importante en la respuesta a la glucólisis. (Semenza G.L. 1998)

La vía energética en la que participa la glucólisis se afecta en los tumores, puesto que donde normalmente tendríamos a la glucosa que se transformaría a piruvato en presencia de oxígeno, pero en este nuevo ambiente hipóxico lo que se genera es un acúmulo de lactato que continua aún en presencia de oxígeno, lo que se conoce como el efecto Warburg, donde en las células normales por efecto Warburg sí resultan afectadas por estos altos niveles de lactato y acidez, pero contrario a lo esperado no sucede así en las neoplásicas. Estudios recientes han mostrado que neoplasias primarias y tendientes a metástasis presentan un alto consumo de glucosa, con ambientes mucho más hipóxicos y con una actividad también más agresiva que sus contrapartes mejor oxigenadas (Gatenby 2004, Jianrong Lu 2014). Estos tumores pueden presentar células en alta replicación por lo cual necesitan de un suministro alto de nutrientes y oxígeno, pero que se encuentran por lo común alejadas de la fuente de oxigenación, razón por lo cual requieren una modificación en su metabolismo celular para poder sobrevivir. En las fases premalignas las células que se están desarrollando alejadas de su base normal de vascularización, presentan una zona de transición importante entre el área hipóxica de la zona oxigenada. Ante un desarrollo acelerado favorecido con mutaciones que utilizan el incremento de los factores de crecimiento, la principal limitante es entonces el suministro de oxígeno, y por lo tal es la barrera a vencer para subsistir y desarrollarse, por lo cual se produce la subsecuente modificación del patrón del metabolismo energético. Este fenotipo con tendencia a la glucólisis inicial se adapta a la hipoxia local de una manera temporal donde posteriormente al mantenerse o hacerse crónica la hipoxia, se producen líneas celulares con una regulación positiva constitutiva hacia glucólisis aun en presencia de oxígeno, con un tejido que por lo tanto ante su contraparte natural se aprecia mejor adaptado a un ambiente ácido y pobre en glucosa. (38)

Importancia del Microambiente Tumoral

El microambiente tiene una situación fundamental para que el tejido neoplásico pueda mantenerse, desde procesos como los explicados de neovascularización donde muchos de los factores de crecimiento provienen de células inflamatorias como mastocitos auxiliares en esta angiogénesis. (Meininger 1995; Yong 1997). Existen similitudes entre la generación del estroma de un tumor y la cicatrización de las heridas, por la participación celular y factores de crecimiento, que si bien cualitativamente participan en ambos procesos, en el caso del estroma tumoral la organización observada es de forma desordenada respecto a los procesos de reparación esperada (Dvorak 1986).

Se ha identificado que la presión de oxígeno dentro del tumor es menor que en el tejido circundante y que en los tumores donde es más intensa la reducción de oxígeno también lo es su posibilidad de metástasis, invasión y muerte posterior de los pacientes (Vaupel, Mayer, 2007), además de presentar una concentración mayor de lactato, dato observado en algunos carcinomas de cara y cuello (Brizel, Schroeder 2001), todo esto se asocia a un mayor riesgo de metástasis. La regulación génica que es impulsada a través de HIF, permite que el pH intratumoral favorezca la expresión de factores que alteran la concentración de lactato, sodio e hidrógeno.

También existen datos que muestran una relación entre la liberación de histamina como inductor de HIF-1 α y posteriormente como éste factor funciona como estimulante a la migración de mastocitos y por respuesta al estímulo de VEGF en el microambiente tumoral. (Jeong et al. 2013) Se demostró que la infiltración de mastocitos y la angiogénesis son procesos que coinciden tanto en tejido normal como tumoral, dato encontrado en un estudio desarrollado con ratones en el cual se utilizó como modelo de CCE en humanos (Coussens, 1999), con lo que se observó que los mastocitos activan el proceso de angiogénesis, y que estos contribuyen a la progresión premaligna al favorecer la degradación del tejido conectivo al ser liberadores de proteasas de serina mMCP-6 (a tryptase), serina mMCP-4 (a chymase) y progelatinasa B, además de liberar factores que amplifican fenotipos angiogénicos (heparina, heparinasa, histamina) proteinasas, y factores de crecimiento como polipéptidos (bFGF o basic fibroblast growth factor) y otros factores involucrados en la angiogénesis como VEGF/VPF (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor) (Bashkin et al. 1990; Vlodavsky et al. 1992; Meininger 1995; Reed et al. 1995) Por otro lado, los mastocitos otorgan mitógenos para fibroblastos, células endoteliales y epiteliales así como están relacionados en actividad enzimáticas, este es un fenómeno que se observa en los bordes tumorales de manera constante (Westphal 1995). Por ejemplo, en el carcinoma de células escamosas de la piel existe una regulación bifásica, donde en una fase inicial premaligna que sucede también en los tejidos normales en reparación, se dan cambios que llevan al tejido a presentar alteraciones celulares de tipo hiperplásico o displásico, momento en el cual los mastocitos están activos e involucrados en la modificación del tejido y reparación, en esta fase los mastocitos degranulan, activan fibroblastos y progelatinasa B, pero si éste efecto se mantiene, progresarán a la fase neoplásica donde los mastocitos intensifican tanto su actividad celular directa como su influencia hacia genes que estimularán factores de crecimiento y procesos

angiogénicos, los cuales son entonces expresados por diferentes vías como HIF-1 α , donde ahora las células tumorales controlarán el fenotipo angiogénico para que la neovascularización pueda ser llevada a cabo (Grützkau et. al., 1998).

Los cambios neoplásicos que se producen en el microambiente permiten el mantenimiento de un tumor, teniendo diversos estímulos como los factores proangiogénicos, que controlan la inmunidad contra el proceso de inflamación o alergia. Los tumores sólidos se benefician de la asistencia de mastocitos que suelen acumularse en la periferia del tumor, cuya presencia esta asociada a la ayuda en la reparación del tejido, pero teniendo una angiogénesis activa como un proceso relevante en la continuidad y supervivencia del tejido anómalo. Es este microambiente que rodea al conjunto de células anormales el que favorece el suministro de otro tipo de factores de crecimiento, factores mitogénicos y de transcripción, con lo cual el potencial de desarrollo y mantenimiento de estas líneas celulares puede ser alcanzado de una manera más eficiente, entre algunos de los más conocidos participan factores como *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *matrix metalloproteinases* (MMP), *transforming growth factor- α* (TGF- α), *platelet derived growth factor* (PDGF), *placenta growth factor* (PIGF), *angiopoietin-1* (Ang-1), *angiopoietin-2* (Ang-2), y el *hepatocyte growth factor* (HGF). (24,50)

Fenómenos de Hipoxia y Reoxigenación en el Microambiente Tumoral

Los fenómenos de hipoxia y reoxigenación son procesos recurrentes en el microambiente inflamatorio y neoplásico, mediado por diferentes citocinas que alteran a las células endoteliales que ante insuficiente aporte de oxígeno y nutrientes son liberadas las citocinas como integrinas, fibronectina, CD36 (*Cluster of Differentiation*), galectinas 1,3,9, activando a células endoteliales cercanas, provocando que los pericitos se separen y se genere dilatación del vaso con la subsiguiente activación de proteasas contra la matriz extracelular y membrana basal, posteriormente las células endoteliales migran y proliferan hacia el área de mayor concentración de factores de crecimiento como VEGF, entonces son depositadas proteínas de matriz y los pericitos estabilizan los nuevos vasos, estas citocinas tienen efectos de adhesión-interacción y proliferación-apoptosis, efectos inmunitarios de la expresión de estas citocinas por células como leucocitos. (Chou, 2004). Se conoce que la persistencia en la producción de oxidantes celulares provoca mutaciones en el DNA y la modificación en la expresión génica, las vías de transducción por AP-1 (*Activator Protein*), NF- κ B (*Necrosis Factor*) modificadas por especies reactivas de oxígeno (ROS) se manifiestan en el patrón regulatorio del crecimiento celular. (L. Mandelker, 2008)

Los tumores sólidos se encuentran inmersos en procesos celulares donde la tasa metabólica es muy activa, mantienen eventos donde existe una alta proliferación celular, al ir aumentando su masa tenderán a alejarse de las zonas mejor perfundidas y que no cuentan con una vascularización central, deberán sobrevivir en un

ambiente que ahora se ha convertido en una zona de baja oxigenación, por lo cual se inician vías que permitan mantener su intenso ritmo de consumo energético, incluidas acciones que permitan el re acceso sanguíneo, es ésta angiogénesis una base importante del mantenimiento de las células neoplásicas y desarrollo del cáncer. La transcripción de genes que codifican proteínas para mantener el nivel de oxígeno se ven favorecidas por múltiples vías que mantienen una expresión coordinada por ejemplo con el factor inducible por hipoxia (HIF) teniendo este mismo, un efecto en la de transcripción de otros genes, para que así la demanda de oxígeno puede ser cumplida y se genere la correcta adaptación metabólica, el proceso de inflamación, adhesión y por ende la angiogénesis, para que las células y el tejido sobrevivan a pesar de la hipoxia o isquemia persistente. La hipoxia en los tumores puede generarse por diferentes situaciones tanto locales como sistémicas, en el caso de las situaciones locales puede darse el caso donde el tumor presenta vasos sanguíneos que tienen un crecimiento anormal y limitado, ya que al continuar la acumulación de fluido en la matriz extracelular que rodea al tumor al mantenerse ésta proliferación celular acelerada, se causa un aumento en la presión intersticial, la expansión del tejido y la subsecuente disminución en el aporte de oxígeno con vasos sanguíneos ineficientes; otra situación se da por una alteración en la difusión atribuible a la forma aberrante que tienden a presentar los tumores, además de efectos sistémicos que pueden provocarse debidos a anemia de tipo paraneoplásica o asociada a terapias.(27) Estos cambios hipóxicos provocan alteraciones en el tejidos tales como resistencia a la radiación ionizante que no permite se genere una adecuada peroxidación del DNA, y ante un microambiente ácido es más propenso a que éste fenotipo celular agresivo pueda propagarse, ya que presenta mejor actividad para sostener una angiogénesis, invasión y metástasis, todo ello mediado por factores como HIF. (27)

La habilidad de autorregulación del crecimiento de las células neoplásicas les confiere más resistencia a lesiones por estrés celular, esto lo logran a través de múltiples defensas contra efectos como hipoxia, citocinas citotóxicas, radiación UV, medicamentos, etc. La hipoxia induce apoptosis y daño celular en la mayoría de las células, sin embargo la resistencia al fenómeno de hipoxia en las células cancerígenas les permite sobrevivir en estas condiciones utilizando a coordinadores génicos y su sobreexpresión como sucede con HIF1- α . (51)

Inmunohistoquímica en el Diagnóstico de Neoplasias

La inmunohistoquímica detecta antígenos en las células de un tejido por la marcación de anticuerpos en las moléculas celulares y extracelulares, como filamentos citoplasmáticos intermedios, sustancias secretoras y proteínas celulares. Ésta técnica ha aumentado la detección de diferentes enfermedades con dificultades diagnósticas con otros métodos y recientemente puede usarse con fines pronósticos. El uso de la inmunohistoquímica ha sido favorecido con el uso de más marcadores antigénicos, estos marcadores o cromógenos permiten la ubicación de antígenos no visibles, pudiendo ser fluorescentes, sistema enzimáticos, radioactivos o de oro coloidal. (10,11,12) .

Los biomarcadores pueden ser medidos y evaluados para mostrar un proceso biológico normal, patológico o una respuesta a un tratamiento y se ha aumentado el uso en diagnóstico e investigación, se han descrito para analizar tanto al cáncer, como en diagnóstico, pronóstico predicción, así como la farmacodinamia en general. Los usos más importantes de los biomarcadores en la inmunohistoquímica son la determinación del origen tumoral o el grado de diferenciación celular, el refinamiento del pronóstico, la diferenciación entre tumores benignos y malignos, la determinación de la estructura molecular de un tejido y la detección de agentes infecciosos en las células o en los tejidos.

Los más usados en dermatología se dividen en los que se usan para diferenciación epitelial como las citokeratinas, CEA, etc, para la mesenquimal la vimentina, actina, VEGFR, etc, para la neuroectodermal el S100, HMB-45, etc, en las hematopoyéticas a las citokeratinas, CD20 (*Cluster of Differentiation*), CD3, CD4, Bcl2, EMA, Ki-67, Bcl6, etc., y en los accesorios al CD1a. (11)

En el fenómeno de angiogénesis se han determinado diferentes biomarcadores que participan como los factores de crecimiento (VEGF) y su interacción con su receptor (VEGFR) y co-receptores de neuropilin (NRP) que actúa como guía celular aumentando la unión del VEGF y su receptor. Existen otros factores interactuando con VEGF-A como PIGF, factor de crecimiento de fibroblasto (FGF), VEGF-D, angiopoyetina, HIF-1 α y HIF-2 α , integrina o PDGF. Sin embargo el proceso de estos factores sucede al mismo tiempo que VEGF-A por lo cual es complejo la ubicación entre los patrones de activación e inhibición del proceso de angiogénesis. (52)

Hypoxia Inducible Factor (HIF) en angiogénesis tumoral

HIF se considera un heterodímero, que presenta dos subunidades, una subunidad permanente o también llamada constitutiva HIF-1 β en el núcleo de la célula, y una subunidad inestable llamada HIF-1 α que se considera la promotora de la transcripción en situaciones anóxicas, mientras esta condición pobre en oxígeno no se cumpla se lleva a cabo un proceso constante de destrucción vía ubiquitinización promovida por la existencia de oxígeno y las dioxigenasas como prolin y aspargil hidroxilasas, siendo más intensa su actividad cuando el oxígeno celular cae por debajo del 1 al 2%, activándose la vía por la cual escapa al proceso de destrucción e ingresa al núcleo, donde una vez dimerizada con la subunidad HIF-1 β , que se unirá a la secuencia promotora específica en el DNA llamada elementos de respuesta a la hipoxia (HRE: 59-A/GCGTG-39 en humanos) y empezará su transcripción a diferentes genes de manera regular como VEGF, EPO, GLUT1.

Aunque existen tres isoformas, la HIF-1 α es la reguladora en estados de hipoxia mientras que la HIF-2 α y la HIF-3 α cumplen funciones diferentes, aunque se encuentran dentro del patrón de su función vía hipoxia (33-49). HIF-1 α también está implicado en la expresión de alrededor de 70 genes relacionados con la progresión del cáncer como el angiopoyetina (Angpt), el receptor 2 VEGF (VEGFR2), al factor de crecimiento de células derivadas del estroma-1a (SDF-1a) al receptor de quimocinas CXC 4 (CXCR4), al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF1). (36,49,53)

El crecimiento de un tumor está íntimamente relacionado con su capacidad de sobrevivencia y crecimiento a través de factores o estimulantes como lo es HIF-1 α , VEGF, cambios en el metabolismo celular y secreción de otras moléculas que le permiten modular la angiogénesis necesaria en su desarrollo y metástasis subsecuente. La expresión de HIF-1 α , es un dato demostrado como factor de agresividad y menor respuesta al tratamiento en tumores, lo cual permite determinar el proceso a seguir en cada caso, utilizando a su vez marcadores de proliferación como Ki67, de angiogénesis VEGF y de mutación de receptores CD117, permite ubicar estos tumores de comportamiento más agresivo. Se tiene a HIF-1 α como factor de transcripción que tiene su efecto como mediador importante en el desarrollo de los tumores sólidos in vivo al promover la angiogénesis y metabolismo anaeróbico con la inhibición de la apoptosis en células tumorales. (53)

En estudios previos se descubrió que la sobreexpresión de HIF-1 α esta relacionado a un pronóstico pobre en tumores en humanos (54). Sin embargo en otro estudio se ha observado una inhibición en la inducción de apoptosis en células tumorales (55). Por otro lado se han hecho estudios para conocer la regulación de HIF-1 α utilizando microRNA para entender su expresión genética, en este caso un miRNA denominado miRNA-17-92 se encontró como regulador en células de cáncer de pulmón. (56) y en otro estudio HIF-1 α se identificó como regulador de miR-20b y este a su vez de HIF-1 α , al estar miR-20b acumulado en las células neoplásicas lo cual les provee un estatus oncogénico lo cual indica que promueve la proliferación, migración, invasión y tumorigenicidad celular (Wang B, 2016). En normoxia existe una alta expresión y promueve el crecimiento celular pero en hipoxia existe una menor expresión, que aunque inhibe el crecimiento celular tumoral, le provee resistencia a la apoptosis. HIF-1 α parece entonces tener su respuesta más importante a nivel protéico y no a nivel de mRNA, probablemente porque las células pueden traducir inmediatamente desde un mRNA ya existente a proteína para adaptarse a el estado hipóxico de forma ágil. (57)

Existen diferentes estudios en tumores en humanos que incluyen al astrocitoma, en vejiga, pecho, cérvix, endometrio, estomago, pulmón, melanoma, oligodendrioma, carcinoma orofaringe o páncreas (Semenza 2009). leucemia (Deeb, G. et al., 2011), linfoma (Evens, A. et al., 2010), donde la presencia de HIF-1 α se ha asociado negativamente. En el caso de los perros se han realizado estudios en linfoma (Kambayashi 2015) con resultados similares. En casos como carcinoma mamario canino se utilizó HIF-1 α en conjunto con VEGF sin embargo sus resultados en la expresión génica de HIF-1 α no presentó correlación, sabiendo que no es la única fuente de generación de VEGF, y considerando que existen en tumores de menor tamaño menos áreas hipóxicas como posibles respuestas a estas consideraciones. (Moschetta et al, 2015)

En el caso particular del carcinoma de células escamosas existe sobreexpresión de la proteína HIF-1 α y ésta sobreexpresión se asocia a una mayor densidad de microvasculatura y expresión de VEGF. Se ha demostrado en un estudio que si existe sobreexpresión de HIF-1 α , esta le otorga resistencia a la apoptosis inducida por hipoxia o terapia antineoplásica. HIF induce síntesis de factores pro angiogénicos como VEGF, endoleitina 1 y EPO como forma de adaptación a la hipoxia dando una neovascularización tumoral. En tratamientos de quimio

radioterapia se observa en ocasiones que las células sobrevivientes se localizan en la zona central del tumor, donde hay menor número de vasos, razón que explica la sobreexpresión de HIF-1 α , se piensa que la vía más importante de señalización a apoptosis por hipoxia involucra del citocromo C a caspasa 9, y en el caso del CCE su apoptosis puede suceder con HIF-1 α , excepto en su sobreexpresión, con niveles altos de moléculas pro apoptóticas como Bax y Bak y bajos de anti apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL. En este estudio se observó en sobreexpresión de HIF-1 α la regulación de señales de sobrevivencia con la supresión de Bax y Bak y la regulación positiva de Bcl-2 y Bcl-XL. (58)

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) en angiogénesis tumoral

El VEGF presenta varias isoformas de las cuales se identifican como parte de la superfamilia de los factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), estas presentan un dominio homólogo. Estas incluyen al VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y al factor de crecimiento placentario (PLGF), en el caso de angiogénesis y vasculogénesis se observa la participación en todos y para linfangiogénesis del C y D. En el caso de los perros se reconocen cuatro isoformas, cada uno de estos tiene receptores específicos del tipo de tirosin kinasa como el VEGFR1 o *fms like tirosine kinasa 1* (Flt1), VEGFR2 o *human kinasa insert domain receptor* (KDR) y VEGFR3 o *fms like tirosine kinasa 4*. El VEGFA tiene afinidad por el receptor 1 y 2, el VEGFB por el 1, el VEGFC y D por el 2 y 3. De esta manera el VEGFA lleva su vía de señalización a través de ATK y del PLC favoreciendo la angiogénesis. Los VEGF pueden ser solubles encontrarse además circulando en sangre, hecho que ha permitido su medición para determinar la progresión tumoral o pronóstico, y en algunas patologías como hemangiosarcoma, enfermedades efusivas, y otros tumores. De manera general en los perros la concentración plasmática se ha encontrado en algunos estudios en menor proporción que en humanos. (33,34,39)

En el VEGF existen varias vías que permiten sea expresado de manera natural, una vez activado el VEGF ante aportes limitados de nutrientes y oxígeno, se liberan factores de crecimiento y citocinas como integrinas, fibronectinas, CD36, CD13 o galectinas que estimula a los receptores en las células endoteliales a crecer y proliferar, para que a su vez permita a los pericitos modificarse, separándose y permitiendo la dilatación del vaso, la secreción de proteasas contra la membrana basal y la matriz extracelular, así tenemos a las células endoteliales migrando y se comienza la proliferación hacia el área más concentrada de factores de crecimiento, depositándose proteínas de matriz, estabilizando a los pericitos con nuevos vasos. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es un factor importante de permeabilidad vascular que afecta específicamente a las células epiteliales vasculares, y es uno de los factores pro angiogénicos más importantes en la carcinogénesis, se encarga de estimular al endotelio a proliferar y diferenciarse, promoviendo el desarrollo de una formación vascular primitiva. Su función biológica se produce al tener efecto en los receptores como *fms-like tyrosine kinasa-1* (FLT-1) y *kinase insert domain containing región* (KDR), estos, se encuentran en las células endoteliales. Los tumores reciben estimulación paracrina y autocrina de VEGF. (59)

VEGF se considera un factor proangiogénico modelo puesto que se solo se presenta en angiogénesis. En el caso de los individuos adultos no se genera exceptuando haya la necesidad de neovascularización. Se conoce que su sobreexpresión está relacionada a la formación de capilares y sin esta no es posible su formación. Su actividad se describe como de actividad mitogénica, con el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) y actividad inducida de permeabilidad vascular, con el factor de permeabilidad vascular (VPF). Es un potente estimulador que permite la proliferación y migración de las células endoteliales. Cuando en un tumor de desarrollo acelerado se incrementa la distancia entre los vasos sanguíneos y las células de alto consumo, la difusión necesaria se vuelve inadecuada y lleva a un estado de hipoxia local, lo cual provoca la formación de VEGF para contrarrestarlo. El desarrollo de los vasos sanguíneos hacia áreas de mayor concentración de factores de crecimiento genera un tipo de crecimiento vascular llamado en brote que es la forma de desarrollo más común, aunque también existe uno por división. Existen conjuntamente factores pro y anti angiogénicos secretándose continuamente, ya sea promoviéndose por reparación o crecimiento que ante alteraciones tipo neoplásicas actúan a favor o contra metástasis o el desarrollo tumoral. En el caso de los tumores, esta secreción de VEGF-A de manera excesiva es lo que promueve una sobreproducción de células endoteliales con un crecimiento del tipo brote, lo cual provocara una vasculatura descontrolada desarrollada en punta.(45,47)

Proteína Ki67 como índice de proliferación tumoral

El Ki67 que es una proteína nuclear no histona que se utiliza como un marcador nuclear que indica crecimiento y división celular, se encuentra expresada en todas las fases activas del ciclo celular y ausente en las células en G0. Este número relativo de células expresando Ki67 o células dentro del ciclo celular en la fase de crecimiento, es lo que se utiliza para determinar el índice. Ki67 es una proteína en la cual no se ha podido identificar una función celular. Pero en el ciclo celular tiene una ubicación subcelular y expresión estrechamente regulada y parece ser necesaria para la progresión dentro del ciclo. En algunos tumores en perros la expresión por células neoplásicas está asociada a pronóstico de manera significativamente.(60)

Por ejemplo se encontró que la expresión de p53 al ser este un gen supresor que mutar modifica la progresión tumoral, donde el aumento en su presencia nuclear esta correlacionada como indicador pronóstico negativo, y la presencia de Ki67 en estos casos se correlaciona con valores de Ki67 altos en tumores como carcinoma de células escamosas y de glándula mamaria en humanos de igual manera con pronóstico negativo.(72) Una alta expresión está asociada en mastocitoma a mayor mortalidad, recurrencia y metástasis independientemente de su grado histológico. Por ejemplo en un estudio se planteó la probabilidad de morir era ocho veces mayor en los pacientes con mastocitoma en perros cuando el índices de Ki67 estaba en >10.6 que otros con expresiones más bajas. (61)

En otros estudios se monsturo que su expresión esta fuertemente asociada con el desarrollo tumoral y se tienen como indicador pronóstico y predictivo, correlacionada con la metástasis tumoral y la etapa, fuertemente

incrementada en tumores malignos comparados con tejido normal. Se considera un índice de marcaje para definir si son de baja, media o alta proliferación con rangos de <15%, 16% a 30% y >30% respectivamente. Con el avance de más técnicas y biomarcadores, se ha ido incrementando su asertividad con el uso conjunto de varios de estos marcadores como en cáncer colorrectal, cervicouterino, linfoma no Hodgkin, melanoma y carcinomas. (Li *et al*, 2015), sarcomas de tejidos blandos y del sistema nervioso central. (62,63,65)

Se ha utilizado una combinación de Ki-67 con AgNOR como pronóstico en mastocitoma canino, en un estudio donde la medición del índice de Ki-67 tuvo en indicador pronóstico al dividir los grados Patnaik 2 en dos grupos con marcada expectativa de supervivencia. (64)

El crecimiento tumoral no solo depende del rango de proliferación de las células neoplásicas, sino además del rango de muerte de esas células. Tumores con índices de marcadores de proliferación bajos y rangos bajos de muerte celular pueden ser tan agresivos como un tumor de alta proliferación pero con una mayor muerte celular. Estos marcadores se usan para estimar el número de células entrando división se ha notado que son más exactas que utilizar solo el conteo de las figuras mitóticas, ya que identifican células en fases S y M, mostrando valor como pronóstico en diferentes estudios en humanos y animales. (65)

Cluster of Differentiation 117 (CD117) en alteración del receptor en tumores

CD117 es un receptor de tirosin quinasa, en general, las quinasas son proteínas que regulan las principales vías de señalización en procesos celulares como crecimiento, supervivencia y diferenciación. Promueven la transducción de la señal dentro de la célula pudiendo activar residuos de los aminoácidos como serina, treonina o tirosina. Pueden ser de superficie como receptores tirosina quinasa (TKR) , citoplasma o núcleo. La desregulación de las quinasas es un mecanismo fundamental que utilizan las células tumorales para promover el crecimiento descontrolado y la supervivencia. En las células tumorales se han identificado múltiples mecanismos de disfunción de las quinasas, incluyendo mutaciones, translocaciones cromosómicas, sobreexpresión de genes y coexpresión del factor de crecimiento y autoestimulación. (66) El c-KIT es una tirosin quinasa transmembranal que actúa como receptor de factor de crecimiento de mastocitos (stem cell factor o kit ligando), este ligando de manera normal está encargado de la maduración y diferenciación de los mastocitos.

Es un receptor tipo III y se identifica en células hematopoyéticas, germinales, del intersticio de Cajal, epitelio ductal glandular mamario, melanocitos y mastocitos. La expresión de KIT se ha detectado en diferentes tumores en humanos. (67) En los perros se han identificado mutaciones del c-KIT en varios exones siendo más común el 11, 8, 15, 19, 29, 38, 40, 42 , algunas veces en los exones 8, 9 y 15 y pocas veces en el exón 17. Cuando se han identificado en el exón 11 se observan duplicaciones en corridas dobles asociadas a grados altos de Mastocitoma y por ende recurrencia y mortalidad. (68)

En el caso de los perros se ha notado que también tiene relevancia en el pronóstico del tumor puesto que se sabe que un 15% de los mastocitomas presentarán mutaciones del c-KIT, incrementando la importancia de su determinación, ya que esto tendrá implicaciones directas en la selección del tratamiento. El c-KIT es un marcador de proliferación y diferenciación celular. (9,19,18).

En el caso del c-kit se conocen tres patrones donde el grado uno es el que no presenta mutaciones y se observa el biomarcador de superficie asociado a membrana, el grado dos presenta áreas agrupadas en el citoplasma de forma perinuclear y el grado tres que presenta marcaje de manera diseminada en el citoplasma. Cuando está presente la mutación existe correlación con menor sobrevivencia postquirúrgica. Se estudio la expresión génica vía mRNA de c-KIT, pero aunque existe sobreexpresión de esta, parece independiente de la localización de la proteína y el tipo de mutación. (69)

Características del Mastocitoma

En el caso de este tumor, no se tiene una etiología precisa en los perros, parece en algunos casos asociarse a procesos inflamatorios crónicos o en presencia de irritantes que modifiquen el microambiente, hay más certeza en definir que se han descartado causas virales, con respecto a predisposición racial, existen estudios que intentan ligar en el bóxer al aumento de la presentación de un fenómeno de expresión cromosómica frágil que en casos en humanos está relacionado al desarrollo de tumores, pero no se tienen claras las alteraciones genéticas que faciliten la presentación. Por ejemplo se han encontrado modificaciones en el gen supresor de tumor p53 aunque no ha sido un hallazgo persistente, también existen reportes en la alteración de la expresión de p21 y p27 que son CDK inhibidoras (cininas dependientes del ciclo), otros estudios se han enfocado en la expresión y alteración del receptor de tirosin kinasa c-kit, que tiene como su ligando al *stem cell factor* (SCF) y es un factor de crecimiento hematopoyético que permite el crecimiento de mastocitos y la liberación de los gránulos dentro del mastocito, en este tumor se aprecian más alteraciones en los grados más indiferenciados. Existen estudios que también intentan ligar receptores hormonales como estrógenos y progesterona aunque aún no es claro su efecto. (3) La presentación de este tumor puede tener origen en células ubicadas en la dermis y tejido subcutáneo, donde estas células maduran y sus gránulos citoplasmáticos se vuelven mayores. Los gránulos de los mastocitos presentan moléculas como aminas vasoactivas, estas son preformadas y almacenadas en ellos e incluyen a la histamina, a la heparina, y se tiñen de manera metacromática con azul de Toluidina. Las aminas almacenadas en los gránulos son liberadas de manera inmediata, mientras que otras son liberadas en el transcurso de horas al requerir la neoformación. (3-5)

Por lo general se conoce que la metástasis se puede presentar en tumores pobremente diferenciados o no diferenciados con rangos desde un 55 a 96%, e inicia con una invasión local y hacia los linfonodos regionales, y posteriormente hacia el bazo y el hígado de manera principal. Una vez que alcanza la vía sistémica. puede

aparecer en médula ósea en grados poco diferenciados y sangre periférica.(3)

Es posible clínicamente observar signos asociados a la actividad de las aminas contenidas en el mastocito, estas incluyen ulceraciones gastrointestinales con presentaciones entre 35 y 80 %, asociadas a la liberación de histamina y activación de los receptores H2 en las células parietales gástricas, favoreciendo la liberación de hidrogeniones y la formación de ácido clorhídrico, la gastrina se ve alterada entonces para controlar el excedente en la formación de ácido clorhídrico. El estado continuo de fácil degranulación por los mastocitos convierte la aproximación clínica en etapas avanzadas en fácil liberación a nivel sistémico y con un efecto hipotensor de la histamina al unirse a receptores H1 a nivel vascular que en procesos de biopsia o cirugía extensa se vuelven frecuentes. La prostaglandina D también se ha postulado en este evento vascular en mastocitosis en humanos o en la presentación gástrica humana (GIT). Existen alteraciones en la coagulación asociadas a la liberación de heparina, retraso en la cicatrización por estimulación inflamatoria persistente, actividad enzimática proteolítica y por acción de las aminas vasoactivas, por otro lado se estudia si los receptores H1 y H2 en los macrófagos favorecen a estos a la secreción de un factor supresor de fibroblastos retrasando aún más la reparación. (3-5)

Clasificación del mastocitoma

Existen diferentes opiniones con respecto a la clasificación de este u otros tumores, desde el precedente clínico, la histología del tumor o más recientemente la presencia o ausencia de biomarcadores aunados a técnicas moleculares cada vez más precisas y recientes. En el caso del mastocitoma se han utilizado sistemas basados en la presentación clínica dividiéndolos por el tipo de lesión, como bien o pobremente diferenciados, en piel o en subcutáneo, con o sin presentación sistémica, por otro lado el refinamiento clásico del diagnóstico se basa en su arquitectura histológica. Las clasificaciones más reconocidas se realizan de acuerdo a ciertos criterios como el grado histológico (Bostock 1973, Turrel 1988, Patnaik 1984, Gerritsen 1998, Ayl 1992, Thamm 1999, 2006, Kiupel 2011), la etapa clínica (Ayl 1992, Gerritsen 1998, Turrel 1988, Thamm 1999), su localización (Turrel 1988, Thamm 2006), el crecimiento y rango de proliferación y ulceración (Allan 1979, Bostock 1973, Bostock 1989, Simoes 1994, Kravis 1996, Thamm 1999, Romansik 2007) o la recurrencia local (Thamm 1999). El sistema Bostock por ejemplo intenta ubicar y entender lo que sucede clínicamente al revisar la relación núcleo citoplasma, figuras mitóticas, pleomorfismo celular, celularidad tumoral, las células tumorales evidentes y los gránulos metacromáticos. Por otro lado, el sistema desarrollado por Patnaik et al., que es el más ampliamente utilizado, divide a los mastocitomas en tres grados, donde el grado I es el más diferenciado y el III el más indiferenciado o pobremente diferenciado, y está basada en criterios como la localización en la piel y subcutis, la morfología celular, la morfología nuclear, la arquitectura del tumor, la celularidad y la reacción en el microambiente, las figuras mitóticas presentes y la presencia de edema y necrosis. El grado I tiene lesiones que está delimitadas a la dermis y zona interfolicular, con células bien diferenciadas, organizadas en grupos o

agregados separados por fibras de colágeno, con células redondas, con citoplasma abundante y gránulos intracitoplásmicos bien definidos, cromatina condensada y sin presencia de mitosis, con mínimo edema y necrosis. En el grado II se aprecian células que infiltran hacia la dermis profunda y tejido subcutáneo, de celularidad moderada a alta, con células pleomórficas grandes y redondas, organizadas en grupos de escaso estroma, que puede ser más denso y rico en colágena, los gránulos tienden a ser un poco más finos y de menor observación, con cromatina más dispersa y un conteo mitótico bajo de 0-2 mitosis por campo, se aprecian zonas de edema y necrosis. En el grado III las células infiltran y reemplazan tejidos profundos, son de tipo pleomórfico redondas, con vesículas, nucléolos prominentes y binucleadas, organizadas de forma compacta, con citoplasma escaso, gránulos finos y difíciles de observar, con un estroma abundante, fibrovascular o fibrocolágeno de tipo denso y áreas de hialinización, las mitosis son frecuentes de 3 a 6 por campo, con edema hemorragias y áreas de necrosis. (3,4,11,29)

Sin embargo existe cierta subjetividad en la interpretación por lo cual otras clasificaciones han surgido (Kiupel et al. 2011), el sistema Kiupel tiene dos graduaciones, justificando la necesidad de evitar los grados intermedios, considerándolos con más ambigüedad a la clasificación y su subsecuente inconsistencia, y está basada en la morfología de las células neoplásicas donde el grado alto presenta kariomegalia (al menos 10% de las células tengan una variación de dos veces el tamaño), presencia de células con núcleos múltiples (tres o más núcleos), núcleos bizarros (tres o más llamados atípicos, con marcadas indentaciones, segmentaciones o formas irregulares) y el número de figuras mitóticas, utilizando un punto de corte conservador de siete figuras mitóticas por 10 campos en 400X, y en el grado bajo están los tumores que no tengan incluidas las características del criterio alto. Éste sistema deja fuera en ambos grados el involucramiento de la profundidad, con la base en la cual no encontraron diferencias en estudios previos a este respecto (Kiupel et al. 2005). Sin embargo ninguna de las clasificaciones puede reflejar fielmente el comportamiento biológico en cada caso, por lo que las guías antes descritas se van modificando, incluyéndose ahora el uso conjunto de sistemas como el Patnaik, Kiupel e Índice Mitótico, por lo que se hace manifiesto la necesidad de utilizar más de un criterio para poder obtener datos fehacientes, al ser vital obtener un panorama sobre su pronóstico (Veterinary Cancer Society Consensus, 2013), y mientras más datos puedan colectarse usando otro tipo de características con la expresión de biomarcadores como c-KIT, Ki67 y AgNOR entre otros, se genera una mejora en el entendimiento del tumor. Éstas características que pueden expresar los tumores son datos importantes que requieren esos estudios como lo es la presencia de la mutación de c-Kit, donde este receptor de tirosin kinasa está desregulado entre un 15 y 40% en el caso de los mastocitomas, asociado entonces a una pobre respuesta clínica, incremento de metástasis y recurrencia local e índices de proliferación mayores (Zemke, 2002, Webster, 2004). La mutación de c-Kit se ha descubierto ocurre en la región transmembranal del receptor por lo cual se provoca una activación constitutiva y con ello se independiza de la presencia de SFC normalmente utilizada en su vía de señalización. Existen para el mastocitoma otros marcadores que se han ido estudiando como fin pronóstico tales como Ki67,

PCNA, AgNOR, BCl2, VEGF, entre otros. Sin embargo en diferentes estudios realizados en perros que presentan mastocitoma, se ha observado que no existe un factor que pueda ser usado de forma única para predecir con seguridad el comportamiento biológico o la respuesta a tratamientos puesto que se puede modificar el resultado ante diversos factores clínicos como la localización, tamaño del tumor, raza, sexo o etapa clínica. (61,64,66)

Inmunohistoquímica en el Estudio de los Mastocitomas

En el caso de mastocitoma se incluyen al CD117 (c-kit) que es un marcador del receptor TKR de tipo transmembranal cuya presencia del receptor CD117, se ha notado que también tiene relevancia en el pronóstico del tumor puesto que se sabe que al menos un 15% de los mastocitomas presentarán mutaciones del c-kit, pero que puede llegar a niveles de 40% (Webster, 2004). El c-kit es un marcador de proliferación y diferenciación celular (9,19,18), el ligando de este receptor se conoce como *steel cell factor* y de manera normal está encargado de la maduración y diferenciación de los mastocitos. En el caso del c-kit se conocen tres patrones, donde el grado uno es el que no presenta mutaciones y se observa el biomarcador en membrana, el grado dos presenta marcaje de manera diseminada en el citoplasma y el grado tres presenta áreas agrupadas en el citoplasma alrededor del núcleo.(32)

En el caso del AgNOR (regiones de organización nucleolar argiofílicas) se utiliza como marcador de proliferación, en esta regiones se buscan estructuras que están involucradas en la transcripción de RNA ribosomal, y se ha visto que la cantidad de AgNOR por núcleo tiene una correlación con el ritmo de proliferación (in vitro e in vivo). Existen otros marcadores como el PCNA que es un antígeno nuclear de proliferación celular y está involucrado en la función de la polimerasa y existen estudios donde demuestran que puede ser tomado como un indicador independiente del grado histológico como factor pronóstico.(19)

El Ki67 es una proteína no histona que se utiliza como un marcador nuclear que indica crecimiento y división celular. (64)

Características del Carcinoma de Células Escamosas en la Piel

El carcinoma de células escamosas (CCE) de la piel se presenta cuando existe una anormalidad en la diferenciación hacia queratinocitos asociada a varios de estos factores como lo son la exposición a la luz ultravioleta y en algunas áreas poco pigmentadas se observan una mayor presentación de casos. Puede surgir desde áreas de hiperplasia, hiperqueratosis, paraqueratosis o acantosis donde el rango de recambio epidermal sea alterado y se favorezca queratinocitos displásicos, los cuales podemos ubicarlos en el plano basal y espinosos, con células en proliferación desordenada que cruzan la membrana basal. (3-5)

Se conocen lesiones que predisponen a la presentación de CCE como la queratosis actínica donde algunos

autores ofrecen datos que hasta un 80% del carcinomas de células escamosas en la piel, procedió de o desde áreas próximas a este tipo de lesiones, siendo esta una dermatosis inducida por la radiación solar UV donde el riesgo se incrementa por las dosis acumuladas de radiación total, sin embargo no se pueden descontar los efectos estocásticos con mutaciones sin reparación del DNA (rayos x, gamma, grenz) (Johnson, 1992, Kraemer, 1987) y la elastosis asociada a radiación UV donde las fibras de colágena y elásticas se degeneran y fragmentan, todas estas lesiones primarias también son referida como un CCE *in situ*, también se asocia a lesiones por papiloma, quemaduras, inflamación o infecciones crónicas (úlceras, tractos, osteomielitis, etc), donde aún no hay invasión de la membrana basal. (Bastin, 1997). Las células escamosas forman parte del epitelio de la epidermis y tienen funciones protectoras claramente descritas, los estímulos frecuentes favorecen la presentación de cambios neoplásicos como alteración en la polaridad, cariomegalia, hipercromatismo, etc. al aumentar la desorganización de proliferación celular de queratinocito. En los cambios se presentan características claras como núcleos atípicos de mayor tamaño, cromatina prominente vesiculada, queratinización del citoplasma, disqueratosis que son lesiones evidentes hacia la formación de la neoplasia. En el caso de perros y gatos se reconoce como la neoplasia frecuente, siendo la primera en gatos y la segunda en perros; en gatos la colocan en una presentación que oscila entre 15% al 49% y en perros del 3% al 20% (Burrows et al., 1994, Goldschmidt & Shfer, 1992, Miller et al., 1991). Este tumor se considera de crecimiento lento, con un comportamiento invasivo local, donde su metástasis ocurre vía linfática en casos poco diferenciados. Se habla de predisposición a los pacientes de pelaje blanco, en los perros los lugares más comunes incluyen la zona subungueal, escroto, plano nasal, piernas, zona perineal y ano, sin embargo hay reportes en otras áreas como los flancos y abdomen de dálmatas, beagles, bull terrier inglés, whippet, keeshound, schnauzer y como una de las razas con menor riesgo colocan al bóxer. En los gatos la presentación es mayor en áreas de poco pelaje en el plano nasal, parpado y la pina, con presentaciones múltiples en la cara en un 30% de los casos. La edad rango medio de presentación esta entre 8 a 10 años en los perros y entre los gatos 9 a 12 años, con el gatos domestico de pelo corto con la mayor incidencia y algunas razas mencionadas con menor riesgo asociadas a su piel pigmentada son himalaya, siamés y persa. Se reportan presentaciones en animales jóvenes en edades desde los 5 a 12 meses de edad. (3-5,29)

Clasificación de Carcinoma de Células Escamosas de la Piel

Mayoritariamente es clasificado de acuerdo a su comportamiento biológico, hay propuestas para clasificarlo en cuatro grados, donde el grado 1 presenta como bien diferenciadas a más del 75% de las células en el tumor, el II presenta entre 50 y 75% de células diferenciadas, el grado III presenta de 25 a 50% de diferenciación y el grado IV presenta menos del 25% (Wright, 2012), sin embargo la mayoría lo interpreta como bien, moderado, pobremente diferenciado o pleomórfico/anaplásico y solo lo deja como descriptivo. En el CCE se valora una combinación de índice mitótico e invasión del estoma y linfonodos. En el caso del CCE oral felino no se ha encontrado que el índice mitótico tenga algún valor predictivo en cuanto a su comportamiento y si la invasión

ósea. Cuando el tejido tumoral presenta características bien diferenciadas formarán nodos de células de queratina llamadas perlas de queratina, sin embargo si están poco diferenciadas formarán capas de células epitelioides pleomórficas. (3)

Existen una gran cantidad de marcadores para lesiones dermatológicas en el caso de carcinoma de células escamosas (CCE) estos tumores presentan componentes como fibroblastos, miofibroblastos, histiocitos, dendrocitos, colágena, elastina y mucina por lo cual en el marcaje se puede incluir a la vimentina (vm), al CD34, al músculo específico de actina (msa), al factor XIIIa, y a marcadores de histiocitos. (11,12,13) Así mismo la expresión temprana y cantidad de otros marcadores como EGFR (receptor al factor de crecimiento epitelial) que es un marcador de membrana donde un RPTPK (receptor de tirosin kinasa kappa) se ha visto como probable involucrado en la desregulación de la expresión del EGFR por oxidación y que en ausencia del RPTPK se sobreactiva (17) que en casos de SCCSCC humanos se ha observado que puede ayudar en la determinación de la agresión del tumor aunado a HER4 (receptor epidermal humano), normalmente utilizados en el cáncer mamario. (14,15,16,17) Por otro lado la activación de ERK 1/2 (vía extracelular de expresión de la señal regulada por kinasas) juega un papel crítico en la proliferación de las células cancerosas, este grupo de MAPK (proteín kinasas activadoras de mitógenos) son un grupo de proteín serina/treonina kinasa que se activan por múltiples estímulos extracelulares y entonces median la transducción de la señal al núcleo, y su implicación en la vías de señalización de los tumores ha tomado más importancia. Recientemente se han utilizado otros marcadores como la proteína involucrina, componente esencial en la envoltura celular observada en las capas corneas de la piel, como factor asociado a privación de oxígeno y marcador de diferenciación, que se desregula en carcinomas de células escamosas pobremente diferenciados, dando pie al uso dentro de un panel de marcaje pronóstico. (22,23,24)

Inmunohistoquímica en el estudio de Carcinoma de Células Escamosas de la Piel

En el caso de carcinoma de células escamosas existen más tipos de marcadores entre los que se utilizan algunos como p63 que es marcador de transcripción nuclear de la familia de los genes supresores de tumor que actúa como factor de transcripción regulando la progresión del ciclo, manteniendo la capacidad de proliferación o induciendo apoptosis, o marcadores de citoqueratina como CK5 que es de alto peso molecular, CK7 que es un filamento intermedio, AE1/AE3 (pancitoqueratina) que son citoplasmáticos o el p53 como marcador de gen supresor, que es nuclear. (11,18,19,24) Algunos marcadores que se han utilizado para poder explicar el pronóstico de los pacientes, por ejemplo en el caso del carcinoma de células escamosas la expresión de VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) y el VEGFR (receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular), se han estudiado para determinar la angiogénesis como se menciona de microvascularización fundamental en el crecimiento y metástasis de los tumores, la observación temprana de estos marcadores pueden auxiliarnos en la determinación del comportamiento del tumor y por ende su pronóstico y además se

abre la ventana como un blanco terapéutico. Se ubican a HIF y p53 como determinantes en la agresividad, metástasis y tratamiento de tumores. La posibilidad de utilizar un mayor panel de marcadores permite poco a poco determinar para cada caso una mejor acción diagnóstica, terapéutica y pronóstica. (71)

IV. Materiales y Métodos

1. Obtención de muestras

Se realizó a partir de archivos de la Unidad Servicios de Diagnóstico y Constatación (USEDICO) del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano (CEIEPAA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, así como de muestras recibidas entre en el período comprendido de 2008 al 2016 de pacientes sospechosos con carcinoma de células escamosas en piel y mastocitoma cutáneo, se recolectaron las piezas quirúrgicas, sin importar sexo o edad. Las muestras obtenidas para el estudio de un total de 48 pacientes (100%), 19 pacientes, el 39.6% presentaron Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (*Figura 9*) de estos el 68.5% fueron perros y 31.5 % eran gatos, en el caso de Mastocitoma (*Figura 8*) el total fueron 29 pacientes, el 60.4% de las muestras, todos perros. El total de gatos en el estudio fueron el 12.5%. Las muestras fueron conservadas en bloques de parafina y posteriormente se usaron cortes de 3 μm y se identificaron utilizando una tinción de Hematoxilina Eosina para ambos tumores, se usó además una tinción de Azul de Toluidina en el caso de mastocitoma. Se utilizó un formato de recepción de la muestra, fotografías de la masa pre y postquirúrgica, y la masa a estudiar. Se realizó una prueba de la persistencia y uso de los epítopes de los antígenos en los tejidos en parafina haciendo una primera revisión de residuos de formol con la tinción de Hematoxilina Eosina y posterior utilización del biomarcador vimentina para verificar exceso en el marcaje de fondo. (*Figuras 1, 2 y 9*)

2. Biomarcadores

Se utilizan como biomarcadores para inmunohistoquímica en mastocitoma a Ki67, CD117, HIF-1 α y VEGF. Se utilizan como biomarcadores para inmunohistoquímica en carcinoma de células escamosas a Ki67, CD117, HIF-1 α y VEGF. Con la finalidad de entender si el tejido presentaba alta actividad hipóxica se decidió seleccionar al biomarcadores anti-HIF-1 α y al ser un factor que induce la actividad de angiogénesis también se seleccionó anti-VEGF para corroborar la relación entre la hipoxia del tejido y la respuesta a la reoxigenación a través de VEGF, en el caso de alguno tumores como el mastocitoma se tiene bien reconocido como biomarcador de actividad celular al anti-CD117 y de varios tumores el índice de proliferación ha arrojado datos consistentes de actividad celular usando el biomarcador anti-Ki67. Los biomarcadores utilizados fueron, HIF-1 α clona GTX127309 GeneTex 1/200 policlonal conejo, VEGF clona RBT-VEGF BioSB prediluido monoclonal ratón, Ki67 clona EP5 BioSB 1/100 monoclonal ratón, CD117 clona EP10 BioSB 1/100 monoclonal ratón. (*Figuras 7, 8 y 10*)

3. Técnica de Inmunohistoquímica

Se realizó la técnica de inmunohistoquímica según instrucciones del fabricante y por el protocolo en capilaridad

con cortes de 1 a 2 µm de los bloques fijados con parafina que previamente fueron seleccionados y colocados en un microarreglo de tejidos. Se utilizó un sistema de detección libre de biotina por polímero universal HRP (*horseradish peroxidase*) MACH1* de BioCare Medical de dos pasos, como cromógeno se utilizó diaminobenzdina (DAB) de DAKO*.

*Para el protocolo utilizado: Ver anexo 1**

4. Criterio de gradación

El criterio de graduación utilizado para los casos de mastocitoma fue por la graduación Patnaik (Patnaik et al., 1984) donde el grado I tiene lesiones delimitadas a la dermis y zona interfolicular, con células bien diferenciadas, organizadas en grupos o agregados separadas por fibras de colágeno, con células redondas, con citoplasma abundante y gránulos intracitoplásmicos bien definidos, cromatina condensada y sin presencia de mitosis, con mínimo edema y necrosis. En el grado II se aprecian células que infiltran hacia la dermis profunda y tejido subcutáneo, de celularidad moderada a alta, con células pleomórficas grandes y redondas, organizadas en grupos de escaso estroma, que puede ser más denso y rico en colágena, los gránulos tienden a ser un poco más finos y de menor observación, con cromatina más dispersa y un conteo mitótico bajo de 0-2 mitosis por campo, se aprecian zonas de edema y necrosis. El grado III las células infiltran y reemplaza tejidos profundos, son de tipo pleomórfico redondas, con vesículas, nucléolos prominentes y binucleadas, organizadas de forma compacta, de citoplasma escaso, gránulos finos y difíciles de observar, con un estroma abundante, fibrovascular o fibrocolágeno denso y áreas de hialinización, las mitosis son frecuentes de 3 a 6 por campo con edema hemorragias y áreas de necrosis.

Con la modificación de Kiupel (Kiupel et al., 2011) donde el grado alto presenta kariomegalia (al menos 10% varíen 2 veces el tamaño), presencia de células con núcleos múltiples (3 o más núcleos), núcleos bizarros (3 o más, llamados atípicos con marcadas indentaciones, segmentaciones o formas irregulares) y un número de figuras mitóticas de 7 figuras por 10 campos en 400X, y el grado bajo donde no estén incluidas las características del criterio alto.

Para carcinoma de células escamosas de piel el criterio de clasificación fue por el grado de diferenciación celular y arquitectura modificado del tipo descriptivo de Broder en tres grados (Wright, 2012), donde el grado I está bien diferenciado con menos del 25% de células indiferenciadas, el grado II es moderadamente indiferenciado con menos del 50% de células indiferenciadas, el grado III pobremente diferenciado con más del 75% de células indiferenciadas.

Ambos tumores observados con las tinciones con HE y azul de Toluidina y para las tinciones de IHQ se utilizó el sistema APERIO para análisis automatizado de imágenes con microarreglo de tejidos. Se definieron los parámetros para el sistema automatizado de imágenes con HIFMe (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha

Membrana), HIF Nu (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Nuclear), HIF PT (Hypoxia Inducible Factor 1 Pixeles Totales), CD117 Me (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Membrana), CD117PT (Cluster of Differentiation 117 Pixeles Totales), VEGF PT (Vascular Endothelial Growth Factor Pixeles Totales), Ki67Nu (Ki67 Nuclear) y Ki67 PT (Ki67 Pixeles Totales).

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico utilizado fue realizado con el programa SPSS versión 20. La parte descriptiva se distribuyó de acuerdo a los grados Patnaik y Kiupel para Mastocitoma y por grado de diferenciación y arquitectura en Carcinoma de Células Escamosas. Se utiliza la prueba de Kruskal–Wallis para comprar el número de pixeles entre marcadores y los valores de la mediana para los pixeles de cada marcador. Se realizó la prueba de correlación de Spearman para los valores de ambos tumores, considerándose correlaciones muy débiles de 0 a 0.19, débiles de 0.2 a 0.39, moderadas de 0.4 a 0.59, fuertes de 0.6 a 0.79 y muy fuertes de 0.8 a 1.

VI. Resultados

1. Obtención de muestras

Se obtuvieron de 48 pacientes, 19 pacientes (39.6%) presentaron Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de estos el 68.5% (13/19) fueron perros y 31.5 % (6/19) eran gatos, en el caso de Mastocitoma el total fueron 29 pacientes, el 60.4% de las muestras, todos perros. El total de gatos en el estudio fueron el 12.5%. (*Cuadro 2, Figura 19*).

2. Biomarcadores

Se obtuvo marcaje positivo para Mastocitoma de los biomarcadores HIF-1 α , VEGF, CD117, Ki67 en algunas de las muestras como se observa en el biomarcador HIF-1 α (*Figura 11*), para el biomarcador VEGF (*Figura 12*), para el biomarcador CD117 (*Figura 13*) y para el biomarcador Ki67 (*Figura 14*).

La presencia de marcaje de IHQ fue positivo para Carcinoma de Células Escamosas de los biomarcadores HIF-1 α , VEGF, Ki67 y CD117 como se observa en el biomarcador HIF-1 α (*Figura 15*), para el biomarcador VEGF (*Figura 16*), para el biomarcador CD117 (*Figura 17*) y para el biomarcador Ki67 (*Figura 18*).

3. Técnica de Inmunohistoquímica

*Para el protocolo utilizado: Ver anexo 1**

4. Criterio de gradación

En los 29 casos de Mastocitoma los resultados de la clasificación histológica por Patnaik fue grado 1 en 14 muestras (48.2%), grado 2 en 14 muestras (48.2%) y grado 3 en 1 muestra (3.4%), para Kiupel fue grado bajo en 19 muestras (65.5%) y grado alto en 10 muestras (34.5%). (*Cuadro 2 y 3, Figuras 20 y 21*)

En el caso de las muestras de Carcinoma de Células Escamosas los resultados de la clasificación histológica fue 6 casos de bien diferenciado (31.57%), 11 casos de medianamente diferenciado (57.8%) y 2 casos de pobremente diferenciado, ambos perros (10.53%). (*Cuadro 4, Figura 22 y 23*)

5. Análisis estadístico

Se utilizó un sistema automatizado de análisis para la identificación de los marcadores utilizados en la inmunohistoquímica de HIF-1 α , VEGF, CD117, Ki67 y estandarización de los mismos. Los parámetros que el usuario definió sobre estos píxeles se cuantificaron, utilizándose un equipo de marca *Aperio ImageScope*, Leica Biosystems®, que cuantifica los píxeles positivos a través de un algoritmo, donde las zonas marcadas se recavaron en el análisis de cada imagen escaneada. Se evaluó la presencia del marcaje para cada uno de los marcadores y en los diferentes grados de clasificaciones del tumor de acuerdo a criterios histopatológicos.

Mastocitoma (Diferentes grados y clasificaciones)

En el caso del mastocitoma la distribución que presentó el biomarcador HIFMe (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Membrana) fue el que más número de registro en pixeles totales tuvo en el conteo, siendo la distribución por grado Patnaik con 6263 pixeles para el grado I, el más alto en el grado II Patnaik con 7888.429 y 7145 en el grado III. Para la clasificación Kiupel el grado bajo presentó 5724.579 pixeles y el grado alto con mayor número de pixeles en 9649.8, con las desviaciones estándar más altas. (*Figuras 24,25,26,27*)

Para CD117 Me (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Membrana) presentó según el grado Patnaik I con 3612.714 pixeles, y en el grado II con 5789.929 pixeles con el conteo más alto en el grado III Patnaik con 6971 pixeles. Para la clasificación Kiupel el grado bajo presentó 3848.316 pixeles y en el grado alto Kiupel con 6549 pixeles. Y en cada caso además, mostraron las desviaciones estándar más altas. (*Figuras 24,25,26,27*)

Para HIF Nu (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Nuclear) la distribución por grado Patnaik con 661 pixeles para el grado I, el más alto en el grado II Patnaik con 629.9286 y 616 en el grado III. Para la clasificación Kiupel el grado bajo presentó 563.21 pixeles y el grado alto con mayor número de pixeles en 798.8. Para HIF PT (Hypoxia Inducible Factor 1 Pixeles Totales) la distribución por grado Patnaik con 661.28 pixeles para el grado I, el más alto en el grado II Patnaik con 815.42 y 1206 en el grado III. Para la clasificación Kiupel el grado bajo presentó 623 pixeles y el grado alto con mayor número de pixeles en 1004.3. (*Figuras 24,25*)

Para Ki67Nu (Ki67 Nuclear) la distribución por grado Patnaik con 873.42 pixeles para el grado I, el más alto en el grado II Patnaik con 1044.64 y 1210 en el grado III. Para la clasificación Kiupel el grado bajo presentó 752.84 pixeles y el grado alto con mayor número de pixeles en 1375.9. (*Figuras 24,25*)

En el caso del mastocitoma de los marcadores observados VEGF fue el que mantuvo las expresiones más bajas, pero mantuvo un aumento en pixeles totales según progresaba el grado tanto en la clasificación Patnaik (173 para grado I, 221 para grado II y 262 para grado III) como en la clasificación de Kiupel (121 para grado bajo y 164 para grado alto). El biomarcador con el registro más bajo fue observado en VEGF PT (Vascular Endothelial Growth Factor Pixeles Totales) siendo más bajo en el grado I Patnaik y grado bajo Kiupel, así mismo con las desviaciones estándar más pequeñas. (*Figuras 24,25*)

Carcinoma de Células Escamosas de Gatos (Diferentes grados)

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas para los pacientes felinos, no se obtuvieron casos grado pobremente diferenciado. La distribución del biomarcador con alta expresión resultó ser CD117Me en el grado bien diferenciado de 1677.5 pixeles y 5176 pixeles en el grado medianamente diferenciado comportándose con expresión mayor según el grado. (*Figuras 28*)

La distribución del biomarcador HIFMe fue el de mayor número de pixeles totales en el conteo, comportándose con expresión mayor según el grado en el bien diferenciado de 2649.5 pixeles y 8976 pixeles en el grado medianamente diferenciado. (*Figuras 28*)

Los demás marcadores tuvieron expresiones considerablemente más bajas yendo desde los grados bajos con 168 pixeles de CD117PT (Cluster of Differentiation 117 Pixeles Totales) en el grado bien diferenciado y 334 en el grado medianamente diferenciado, el Ki67 PT (Ki67 Pixeles Totales) fue en grado bien diferenciado de 297.5 pixeles y de 553 pixeles en el grado medianamente diferenciado. En el caso de HIFNu y Ki67Nu (Ki67 Nuclear) mantuvieron números de expresión semejante 302 y 465 respectivamente en los grados bien diferenciado y

pero en el grado medianamente diferenciado fue mucho mayor con 1413.25 para HIFNu y 1160.5 para Ki67Nu. Para HIFPT (Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Pixeles Totales) en el grado bien diferenciado fue de 737 pixeles y de hasta a 1096 pixeles en el grado medianamente diferenciado. Para el marcador VEGF el conteo fué 196.5 pixeles en grado bien diferenciado y 488.5 pixeles en grado medianamente diferenciado. En general la expresión aumento según el grado. (Figuras 28)

Carcinoma de Células Escamosas de Perros (Diferentes grados)

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas en perros se pudieron observar casos en tres grados de clasificación histopatológica. (Figura 22)

La distribución del biomarcador CD117Me fue de niveles altos de pixeles, en el grado bien diferenciado fue de 1619.5 pixeles, 3217.429 pixeles en el grado medianamente diferenciado y 1837 pixeles en el grado pobremente diferenciado, con una disminución del grado medianamente diferenciado al pobremente diferenciado, pero manteniéndose el grado pobremente diferenciado en número mayor al bien diferenciado.

La distribución del biomarcador HIFMe fue el de mayor número de pixeles totales en el conteo, comportándose con expresión en el grado bien diferenciado de 25912.5 pixeles, 4023.714 pixeles en el grado medianamente diferenciado y 2597.5 pixeles en el grado pobremente diferenciado. (Figura 29)

Los demás marcadores tuvieron expresiones considerablemente más bajas yendo desde los grados bajos con 166.5 pixeles de CD117PT en el grado bien diferenciado, 386.85 pixeles en el grado medianamente diferenciado y 143 pixeles en el grado pobremente diferenciado y el Ki67PT fue en grado bien diferenciado de 221.5 pixeles, de 763 pixeles en el grado medianamente diferenciado y 74.5 pixeles en el grado pobremente diferenciado, siendo menor la expresión en este caso en el grado pobremente diferenciado de ambos marcadores. En el caso de HIFNu y Ki67Nu mantuvieron números de expresión semejante 355.25 y 357.5 respectivamente en los grados bien diferenciado, en el grado medianamente diferenciado fue de 619 pixeles para HIFNu y 726.71 pixeles para Ki67Nu, los grados pobremente diferenciados fueron de 467.5 pixeles y 222.5 pixeles en grado pobremente diferenciado para Ki67Nu, este último tuvo la menor expresión en el grado pobremente diferenciado. Para HIFPT en el grado bien diferenciado fue de 592 pixeles y de 877 pixeles en el grado medianamente diferenciado pixeles y 727 pixeles en el grado pobremente diferenciado. Para el marcador VEGF el conteo fue de 395 pixeles en grado bien diferenciado, 884.57 pixeles en grado medianamente diferenciado y 127.5 pixeles en grado pobremente diferenciado. (Figura 28) En este caso existió una expresión menor de marcadores en el grado pobremente diferenciado de CD117PT, Ki67Nu, Ki67PT, VEGFPT. (Figura 29)

Comparación entre Carcinoma de Células Escamosas y las Especies.

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas, la distribución por especie mostró que el HIFMe fue el biomarcador que más registro en pixeles totales tuvo en el conteo, siendo el más alto en el caso de los felinos que en los perros, seguido de CD117 Me de igual forma, en el caso del mastocitoma fueron también los marcadores con mayor conteo de pixeles. Además fueron estos marcadores HIFMe y CD117Me los que mostraron las desviaciones estándar más altas en los tres grados. En el caso de los perros el biomarcador con el registro más bajo fue observado en Ki67 PT en el Carcinoma de Células Escamosas y en el caso de los

felinos fue VEGFPT en el mismo tumor y en el Mastocitoma en perros. Con respecto a las desviaciones estándar más pequeñas fueron en gatos HIF 1aNu 119.5 en el grado bien diferenciado del Carcinoma de Células Escamosas y en perros con el Carcinoma de Células Escamosas Ki67PT con 99.7, en el caso de Mastocitoma se registro con el marcador VEGFPT en el grado I Patnaik con 121.9 y Kiupel grado bajo con 122.18. VEGFPT tuvo en general en todos los tumores una expresión baja. (Figuras 25,26 28 y 29).

Correlaciones entre biomarcadores para Mastocitoma y Carcinoma de Células Escamosas

En el caso del Mastocitoma se realizó la prueba de correlación de Spearman y mostraron desde fuertes a muy fuertes asociaciones entre marcadores de manera general. HIFNu presentó el promedio de correlaciones más bajas con los demás marcadores siendo su más alto con VEGFPT con 0.8279 de tipo muy fuerte y la más baja con CD117Me con 0.7103 de tipo fuerte. La correlación más alta sucedió entre HIFMe y HIFPT de tipo muy fuerte con 0.9448, seguida de HIFMe con CD117Me de tipo muy fuerte con 0.9093. HIFMe y CD117Me fueron los biomarcadores que mantuvieron correlaciones muy fuertes con la mayoría de los demás, exceptuando las marcadas como asociaciones fuertes de CD117Me con HIFNu (0.7103) y VEGFPT (0.7239) y HIFMe con HIFNu (0.7586), VEGFPT (0.7459) y Ki67Nu (0.7128). Las correlaciones más bajas se presentaron entre Ki67Nu y VEGFPT con 0.638995 siendo de tipo fuerte. (Figuras 30,31,32,33)

En las divisiones por grado histológico, las correlaciones de menor nivel sucedieron en Kiupel de grado bajo con Ki67Nu con CD117PT (0.5508) como asociación moderada y en el grado alto con Ki67Nu y HIFPT (0.6121) de tipo fuerte. El biomarcador con el promedio más bajo en Kiupel de grado bajo fue Ki67Nu (0.7034) que se considera fuerte. En el grado Kiupel alto hubo dos correlaciones con menor promedio CD117Me y Ki67Nu (ambas de 0.7523) de tipo fuerte. Las correlaciones más altas sucedieron en la clasificación Kiupel de grado bajo fue con HIFPT y HIFMe (0.9859) de tipo muy fuerte, seguido de HIFMe y CD117Me (0.9105) de tipo muy fuerte, en Kiupel grado alto sucedió la mayor asociación entre HIFNu y VEGFPT, Ki67PT y VEGFPT (0.9393) ambas de tipo muy fuerte, seguido de HIFPT y Ki67PT (0.9272) también de tipo muy fuerte. El promedio más alto de correlaciones sucedió en Kiupel grado bajo HIFMe (0.8412) y en el grado alto Ki67PT (0.8943). (Figuras 30,31,32,33)

Las correlaciones en el caso de la clasificación de Patnaik mostraron que el nivel más bajo de asociación sucedió en el grado I entre HIFMe y VEGFPT (0.7494) de tipo fuerte, en el grado II entre Ki67Nu y VEGFPT (0.4329) de tipo moderado y en el grado III al haber solo un dato no fue considerado. El grado II Patnaik mostró tener las correlaciones de menor valor en diferentes marcadores. El biomarcador con el promedio más bajo en la clasificación Patnaik grado I fue con VEGFPT (0.8102) con asociación de tipo muy fuerte y en el Patnaik grado II fue Ki67Nu (0.608) con asociación de tipo fuerte. Las correlaciones de mayor nivel en la clasificación Patnaik en el grado I sucedió en la asociación de HIFMe y HIFPT (0.9912) de tipo muy fuerte, seguido de HIFNu y Ki67Nu (0.978) de tipo muy fuerte, en el grado II Patnaik sucedió entre HIFMe y CD117PT (0.9384), seguido de HIFMe y Ki67PT (0.9296) de tipo muy fuerte. El promedio más alto de correlaciones en el grado Patnaik grado I fue Ki67PT (0.8703) y en el grado Patnaik II (HIFPT) (Figuras 30,31,32,33) Comparando las dos clasificaciones y grados el promedio de correlaciones fue menor en el grado II Patnaik (0.7873) y mayor en el grado I Patnaik (0.848)

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas se realizó la prueba de correlación de Spearman tanto en los

casos de perros como de gatos. Se pudo observar que el promedio de las correlaciones más débiles sucedieron en el tumor de Carcinoma de Células Escamosas en los perros, entre ellos la correlación más débil fue entre el grado y el biomarcador VEGF PT que fue negativo -0.018 (muy débil) (Figura 25), siendo el grado además el de promedio general contra todos los otros biomarcadores más bajo con 0.102 (Figura 26), el comportamiento del grado tuvo mejor correlación en gatos con 0.49 (moderada) que en perros que fue 0.2 (débil). La correlación más fuerte sucedió entre HIF Nu con HIF PT con 0.9 (muy fuerte) seguido de HIF Me con Ki67 Nu de 0.863 (muy fuerte) (Figura 27), y el promedio de correlaciones más fuerte sucedió contra todos los otros biomarcadores con el biomarcaje CD117Me con 0.69 (Figura 24). En el caso de los gatos el promedio de correlaciones del tumor Carcinoma de Células Escamosas se comportó con valores más altos que los perros, entre ellos la correlación más débil fue negativo entre el biomarcador HIF Nu con HIF PT con -0.029 (Figura 28) siendo el promedio de correlaciones más débiles entre el biomarcaje HIF-1a Nu con 0.2 (Figura 30) y la correlación más fuerte sucedió entre varios biomarcadores con 0.94 con Ki67 Nu contra HIF Me, CD117Me y VEGF PT, y de VEGF PT con CD117 Me (Figura 31) y el promedio de correlaciones más fuerte sucedió con el biomarcaje Ki67 Nu. (Figuras 34 y 35)

Se utilizó la prueba de Kruskal – Wallis, para comprar el número de pixeles entre marcadores, y los valores de la mediana para los pixeles de cada marcador.

En el caso del Mastocitoma se obtuvieron los siguientes resultados de CD117Me (3815), HIFMe (6247), HIFNuc (607), Ki67Nu (795), VEGFPT (178). Kruskal-Wallis chi-squared = 93.073, df = 4, p-value < 2.2e-16. Por lo cual si hay diferencias entre las medianas de los grupos entre los biomarcadores HIFNuc con CD117Me y HIFMe, del biomarcador Ki67Nu con CD117Me y HIFMe, y el biomarcador VEGFPT con CD117Me, HIFMe, HIFNuc, Ki67Nu.

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas en los gatos se obtuvieron los siguientes resultados de CD117Me (3468.5), HIF1aM (5401.0), HIF1aNu (956.0), Ki67Nu (822.0), VEGFPT (408.5). Kruskal-Wallis chi-squared = 12.51183, df = 4, p-value 0.01392462. Por lo cual se aprecia que si hay diferencias entre las medianas de los grupos entre los biomarcadores HIF1aM con Ki67Nu.

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas en los perros se obtuvieron los siguientes resultados de CD117Me (2779), HIF1aM (2592), HIF1aNu (435), Ki67Nu (428), VEGFPT (510). Kruskal-Wallis chi-squared = 27.55595, df = 4, p-value = 1.534318e-05. Por lo cual se aprecia que si hay diferencias entre las medianas de los grupos entre los biomarcadores HIFM con HIFNu, HIFM con Ki67Nu y HIFM con VEGFPT.

VII. Discusión

En el caso del tumor Carcinoma de Células Escamosas en los gatos presenta correlaciones positivas entre el grado y los biomarcadores usados, de manera más alta que en perros, encontrándose en los gatos asociaciones moderadas a fuertes y en perros como débiles, posiblemente influenciado en la presentación más agresiva que llega a ser observado en esta especie, pero con respecto a la agresividad o pronóstico de manera menos clara. Los biomarcadores con más expresión resultaron ser CD117Me, HIFMe comportándose con expresión mayor según el grado, los demás marcadores tuvieron expresiones considerablemente más bajas en los grados bajos de CD117PT, HIFPT, Ki67PT VEGF y de HIFNu, pero la expresión mantuvo un aumento según el grado. Por lo cual la actividad celular y el efecto hipóxico y se incrementa conforme el tumor avanza según lo que se conoce en cuanto al grado histológico y podríamos esperar al aumento en la expresión de estos. (16,17,20,26,60,68,69)

En el caso de Ki67Nu y HIFNu mantuvieron números de expresión semejante respectivamente en los grados bajos y en los grados altos Registros que pueden ser similares a otros estudios en cuanto a que aumenta la expresión según el grado. (53,54,69)

En el caso del Carcinoma de Células Escamosas para los pacientes caninos los biomarcadores como CD117Me y HIFMe tuvieron mayor expresión, y fue significativa la diferencia con los demás marcadores, En comparación con la expresión de HIF-1 α , la expresión de VEGF se observó en conteos relativamente bajos, el comportamiento de HIF-1 α en este nos indica una respuesta fuerte a hipoxia, sin embargo la respuesta esperada de angiogénesis por VEGF no presenta los niveles tan elevados, pudiendo sugerir que no sea la primer vía de señalización o que no es la vía más importante en la actividad que tiene este tumor, sabiendo que presenta un proceso agresivo inflamatorio pero que su vía de expansión es de preferencia linfática, nos sugiere que la angiogénesis pudiera no estar participando tan intensamente como lo hacen otras vías. Existe un aumento según el grado, que aunque es notorio del grado bien diferenciado al medianamente diferenciado, no continua hacia el pobremente diferenciado, aunque se mantiene por encima de valores del grado bien diferenciado, pudiera explicarse la falta de un mayor número de casos en el grado pobremente diferenciado que modifiquen la tendencia y expliquen más claramente la relación entre el grado de alteración del tumor y la expresión de su actividad a través de los marcadores.

En el caso del mastocitoma de los marcadores observados VEGF fue el que mantuvo las expresiones más bajas de todos ellos, pero mantuvo un aumento según progresaba el grado tanto en la clasificación Patnaik como de Kiupel. Al ser un tumor con una alta tasa de actividad y procesos celulares que permiten una expansión y metástasis rápida en grados altos, se hubiera esperado una actividad de VEGF al mismo nivel o semejante a su proceso de señalización como lo es HIF-1 α .

Ki67 se comportó como lo expresan otros estudios siendo más bajo en el grado I Patnaik y más alto en el grado III Patnaik, pero no así con respecto a la graduación Kiupel, donde Ki67 fue menor en el grado alto, pudiendo deberse a que ninguna clasificación histopatológica determina adecuadamente el comportamiento biológico y aquí se observa un parámetro que indica actividad celular que nos hace pensar en que refleja de forma más adecuada o delinea las diferencias subjetivas entre grados. Siendo el Ki67 un marcador que nos

indica actividad celular presente, en un grado histológico alto con mayores cambios morfológicos en el tumor, es esperado que su actividad fuera a la par con esos cambios, favoreciendo un creciente número de mutaciones y por ende reacciones más severas para el microambiente y complicaciones al paciente. (11,32,60,61,62,63)

En el caso del CD117Me y CD117PT también mostró una mayor expresión en el grado III Patnaik y fue menor con cada grado, e igualmente con los grados Kiupel que en otros estudios se aprecia un cambio en este marcador, el CD117 es un marcador de la actividad receptora de tirosin kinasa como señal de crecimiento, con lo cual su presencia nos muestra una actividad mayor según el grado, alteración que se ha encontrado en otros estudios, la finalidad de demostrar su actividad mayor según el grado y no solo la presencia del marcaje, orienta a ubicar cambios no solo en conformación sino en interacción con el microambiente tumoral (11,20,32,60,68,69,70)

En el caso de HIF-1 α su comportamiento en los grado II fue mayor que en el grado I según Patnaik siendo entonces mayor según el grado, pero aunque si se presentó más alto en el grado III Patnaik contra el grado I, no fue el de más alto nivel de los tres grados presentados siendo el grado II donde sucedió el valor más alto, pudiendo hipotetizar que no es tan sensible para estos casos, aunque el número de pacientes para grado III podría estar subrepresentada y es necesario un mayor número de casos para determinar si continua la tendencia, además que la expresión más notoria fue de tipo membranal. En el caso de la expresión nuclear sucedió en modo inverso y con expresión menor a la observada para HIF-1 α membranal, y para la expresión total de HIF-1 α si fue mayor la expresión observada según el grado Patnaik aumentaba. En el caso del grado Kiupel tanto el HIF-1 α membranal, nuclear y el total sucedió la expresión en modo inverso al grado siendo menor la expresión en el grado alto, por lo que podría pensarse que los casos en los que histopatológicamente no era claro si presentaban cambios que los definiera como grado II o III Patnaik, se esperaría que la clasificación Kiupel ajustara esa situación por lo que en ambos aumentarían la expresión de HIF-1 α ya que serían de clase alta en esta graduación, con una actividad biológica incrementada y no menor. Aunque los cambios histopatológicos se interpretan como de grado alto Kiupel o Patnaik II o III, biológicamente su actividad los reclasifica como de menor intensidad, si bien la expresión y cambios histopatológicos fue en ambos mayor que en el grado I Patnaik, aunque es necesario realizar pruebas más específicas con los datos analizados para ubicar la vía de señalización que es utilizada en los diferentes biomarcadores con lo cual se pueda determinar la influencia específica que tiene cada uno en el desarrollo tumoral y su actividad de transcripción génica. Sin embargo la presencia de estos marcadores demuestra que existe actividad en el tumor y refleja en cierta manera el grado histopatológico .

Se encontró marcaje de HIF-1 α a nivel membranal en ambos tumores, localización que no es la comunmente reportada y hasta el momento de la impresión no fue posible encontrar en otro estudio de estos tumores como mastocitoma y carcinoma de células escamosas o algún otro tumor donde se pueda ubicar la localización membranal. Existen estudios sobre los cambios en localización de la expresión en los biomarcadores en diversos patologías, se reconoce a la ubicación atípica de algunos marcadores como indicador de que las proteínas han sufrido cambios subcelulares y es la razón por la cual son localizados de esta manera, indicativo de una enfermedad como sucede en el cáncer (Kumar, 2014), razón que lleva a pensar que el marcaje membranal observado con HIF-1 α a nivel membranal, y que mantiene características consistentes entre las muestras, pudiera relacionarse a mutaciones en la localización de la señalización celular así como sucede con

otros marcadores en tumores como en el carcinoma hepatocelular ROBO1 (*Roundabout homolog 1*), en tumor mamario humano BTNL2 (*butyrophilin like 2*), en cáncer de próstata RASGRF2 (*Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2*) o en tumor de vejiga FGFR1OP2 (*Fibroblast growth factor receptor oncogene partner 2*) o en cáncer prostático HIF-1 α (Kimbrow KS, Simons JW, 2006), las mutaciones son una pauta en diferentes tumores para reconocer un cambio y tipo de neoplasia (Scherer, 2007) como biomarcadores NOTCH1 (*Notch homolog 1, translocation-associated (Drosophila)*) en carcinoma de células escamosas de pulmón, MLL2 (*Lysine-specific methyltransferase 2D*) en carcinoma de células escamosas (Rudin, 2012), EGFR en tumor de pulmón (Bruin E, 2015), BRAF (*B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase*) en adenocarcinomas o PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) en cáncer de células pequeñas de pulmón (Devarakonda, 2015) donde una mutación puede suceder en alguna proteína específica, así, algunos estudios sugieren que la activación patológica de estos biomarcadores pudiera evidenciar un trastorno específico asociado y a través del análisis de todo el genoma se ha demostrado en tumores sólidos que suelen contener que entre 20-100 genes que codifican proteínas están mutados (Qing Wang, 2011), por lo que ubicar proteínas que señalicen oportunamente modificaciones que confieran algún tipo de variación es vital. Pueden usarse técnicas más precisas para la determinación de actividad tumoral presente, como lo es en plasma con la prueba *Circulating cell-free DNA (cfDNA)* donde se puedan ubicar fuentes de mutación tumoral activas (Garm Spindler, 2015). El detectar nuevas vías de señalización o encontrar mutaciones y alteraciones en la ubicación de un biomarcador puede ser la primer pauta a descubrir estas actividades anómalas, a la vez que se podrán reconocer nuevas subclasificaciones o estirpes en general (Chen, 2017). En casos como en el Carcinoma de Células Escamosas en humanos se han identificado una cantidad frecuente de mutaciones detectables con biomarcadores (Graves, 2012) Esto transformara nuestra visión sobre la realidad de la actividad tumoral y el actual control que se debiera tener sobre el tumor, así como el uso de medicamentos más específicos de acuerdo al momento específico de actividad en la vida del tumor y por ende se hace vital poder ubicar cualquiera de los cambios que se están llevando a cabo, sea en la la forma, la cantidad, la calidad o la localización de una proteína.

El microambiente que rodea a este conjunto de células anormales favorece el suministro de factores de crecimiento y factores mitogénicos, con lo cual el potencial de desarrollo de este tipo de células puede ser alcanzado de una manera más eficiente. Cuando estos tumores sólidos mantienen zonas dentro de su microambiente con un flujo empobrecido de oxígeno las secuelas dadas por hipoxia marcan un cambio en su funcionamiento y es en el metabolismo energético el que se debe tener un control mayor por parte del tejido, ya que al irse transformando el tumor, sus necesidades se ven corregidas por estos factores de transcripción, para permitir que sobreviva, que tenga facilidad para adaptarse a los cambios, y que prosiga en una cadena de eventos crónicos para desarrollo. (13-22)

El mastocitoma en piel y el carcinoma de células escamosas de piel son considerados tumores de alta frecuencia y con características fuertemente inflamatorias y angiogénicas, donde la influencia de factores mitogénicos y de crecimiento principalmente que confluyen en vías de señalización dentro del microambiente tumoral, y se encontraron correlaciones altas en las expresiones de Ki67 o CD117 con la generación de HIF-1 α por lo cual las vías de señalización normales como tumorales se encuentran activas así como con la relación con VEGF, en conjunto datos reconocidos de proliferación de índices de Ki67 y mutaciones de la localización de

receptores de tirosin kinasa (CD117) (Markku Miettinen 2005) corroborar esta situación. En estos tumores existe un continuo estímulo entre los biomarcadores seleccionados que siguen favoreciendo el desarrollo tumoral y es importante establecer si la condición hipóxica aumenta la actividad de mastocitos en ambos tumores y este proceso inflamatorio incrementa también este estado activo de proliferación utilizando técnicas como la *Circulating cell-free DNA*. La expresión de HIF-1 α , Ki67, VEGF y CD117 se pudo demostrar en los tumores Mastocitoma y Carcinoma de Células Escamosas en ambas especies, entendiendo que su utilidad en el conocimiento del microambiente tumoral y su actividad tanto en procesos inflamatorios, hipóxicos o angiogénicos es relevante. Las diferencias que aparecieron por grado, tipo de tumor y especie, obliga a realizar diferentes estudios biomoleculares del tipo genómico sea transcryptómica y proteómica, entre ellos como el uso de PCR, microarreglos de DNA, hibridación *in situ*, que permitan al analizar más a fondo los genes y su expresión más detallada para identificar tanto las vías que confluyen o el momento de actividad más alto con el fin de ofrecer un mejor panorama para su uso extendido (Poste G, 2001). Con la expresión de HIF-1 α en Mastocitoma y en Carcinoma de Células Escamosas se obtuvieron datos que al observar con otros estudios estos han encontrados que sirven como factor de agresividad y menor respuesta al tratamiento en tumores, lo cual permite determinar el proceso a seguir en cada caso y aumenta el valor de su utilidad en nuestro campo. (49,51,53) Utilizando a su vez marcadores de proliferación como Ki67, de angiogénesis VEGF y de mutación de receptores CD117, permite ubicar estos tumores de comportamiento más agresivo, los datos indican que existe esta actividad y aumenta según el grado, pudiendo observar no solo su presencia (32,33,40,43) Los resultados obtenidos en relación con la participación de HIF-1 α y la graduación histopatológica de los tumores aumenta la importancia de indagar el proceso en el microambiente y las vías de señalización que confluyen y afectan al comportamiento biológico observado en los tumores, pudiendo aclarar etapas de estos más allá de su forma y de ser viable antes de que estas alteraciones tengan un cambio observable, los niveles en cada uno de ellos se tiene que determinar para definir si es posible utilizarlo como un buen indicador en la progresión del tumor, como se ha demostrado en otros tumores. Si bien existen datos más claros para ciertos tumores en humanos, algunos estudios en perros no han presentado datos que aporten los mismos resultados (53,54,57) Para el caso de hipoxia y angiogénesis existió una correlación fuerte entre los biomarcadores HIF-1 α y VEGF considerándose que estarían mostrando actividad de respuesta celular ante hipoxia y por consiguiente la necesidad de angiogénesis debe ser cumplida. En el caso del mastocitoma las correlaciones marcaron una asociación fuerte y muy fuerte, considerando el tipo de actividad del tumor se esperarí esta correlación aunque el grado de expresión no haya sido tan elevado. En el Carcinoma de Células Escamosas las correlaciones en perros se encontraron en niveles de moderada a fuerte y en los gatos de fuerte a muy fuerte, aunque de igual manera en ambos tumores la expresión de VEGF no estuvo en el mismo nivel que HIF-1 α pero fue significativa la diferencia. Quizá existen criterios no morfológicos que pueden identificar los diferentes grados de actividad tumoral que no se identifican unicamente por los cambios morfológicos a nivel de microscopía óptica en el tejido neoplásico.

El creciente interés en definir especificidades como pronóstico, predicción, riesgo a metástasis, proliferación, menor respuesta a tratamientos o mayor mortalidad en medicina veterinaria como lo es en medicina humana favorece la investigación de biomarcadores en todo tipo de tumores y la búsqueda de paneles que definan estas

interrogantes. Los resultados observados en diferentes estudios en relación con la participación de HIF y su utilización en la designación de pronóstico de algunos tumores aumenta la importancia de indagar más claramente el proceso por el cual pasan los tumores y la posible identificación de la etapa tumoral. Si bien existen datos más claros para ciertos tumores en humanos, algunos estudios en perros no han presentado datos que aporten los mismos resultados.(4,5,7,8,9,12,13)

A la vez que los estudios de los procesos neoplásicos van evolucionando y se van descubriendo más trastornos que afectan directamente a las células neoplásicas, a su adaptación al entorno y a su creciente resistencia a los tratamientos que se instauran, se denota un factor sumamente relevante, y es el análisis de estos procesos de una manera más eficiente y natural, donde se permite observar la relación entre células normales y anormales en un mismo tejido sin control de un ambiente que influye en el desarrollo y su readaptación. Todo esto lleva por necesidad a mejores modelos para comprender los procesos de tumorigénesis, aquí es donde la oncogénesis natural se vuelve clave indispensable para lograr entender esta brecha de alteraciones provocadas en el laboratorio y las respuestas de interacción en un individuo sin modificaciones experimentales. Entre las habilidades más estudiadas, la comprensión más profunda y control de la angiogénesis se torna un punto básico en el manejo del cáncer, desde la corrección de un tratamiento hasta la determinación en el avance de malignidad del tejido tumoral. El tratamiento ha ido evolucionando con el conocimiento de la relevancia del control de la angiogénesis tumoral, pues estos tumores asociados fuertemente a angiogénesis donde se observan valores altos de HIF-1 α como carcinoma mamario presenta mayor agresividad, metástasis y menor rango de supervivencia (Mimeault, 2013, Yamamoto, 2008)

El entendimiento en el desarrollo y evolución del cáncer ha sido un proceso complejo que se ha ido dilucidando gracias a las investigaciones en diferentes modelos, la participación de pacientes en pequeñas especies con situaciones y vidas bajo condiciones similares ofrece una ventaja en la generación de un nuevo conocimiento que contempla el desarrollo y tratamiento de la enfermedad natural. Existen múltiples procesos en este fenómeno, entre ellos la angiogénesis plantea un reto a controlar, pues es un paso fundamental en la generación de un tumor, con la formación de nuevos vasos sanguíneos y mejora en la posibilidad de crecimiento y diseminación. Mientras más detalles se conocen en la generación del cáncer más interés se genera en entender como se modifican y sus las habilidades adquiridas en la manutención de estas nuevas células para un desarrollo independiente y continuo, es aquí donde los tumores en las mascotas han ido tomando cada vez más relevancia en la medicina veterinaria y humana, si se entiende la necesidad de tener modelos animales de tumores con un desarrollo de un modo más natural para compararlo con el de humanos, como sucede ya con estudios de carcinoma de células escamosas en piel que se produce en cabeza y cuello en perros y gatos, modelos de varios tipos de cáncer en perros, cambios genéticos y utilización de fármacos para el tratamiento de cáncer, entre otros. Una correlación entre los factores conocidos de tipificación y pronóstico aunado a mejores y más detallados datos de biomarcadores darán una opción de entendimiento de los procesos de generación del cáncer y a un tratamiento por tanto cada vez más eficaz. Los modelos animales que presentan la enfermedad natural contienen más similitud a los ocurridos en humanos, donde el cuidado y atenciones medicas han permitido un aumento en la calidad de la vida y cantidad de años y se aprecian de mejor manera los cambios secundarios a la exposición diaria en mismo entorno de convivencia con el humano, situación que en los

modelos de laboratorio no pueden ser reproducidos fielmente, sin contar con las modificaciones continuas y crecientes al cuidado y control en el uso de animales de laboratorio. (26,27,28,29,30,31)

VIII. Referencias

1. Bonagura John D.; Kirk's Current Veterinary Therapy XIV; Edit Saunders Elsevier, 2009, St Louis Missouri, USA,
2. Pavletic Michael M.; Atlas of Small Animal Wound Management and Reconstructive, 3rd Ed. W.B. Saunders Company, 2010, USA.
3. Withrow Stephen J, Vail David M, Page Rodeny L; Withrow & MacEwen's Small Animal Oncology; 5th Edition, Elsevier Saunders, 2013, St Louis Missouri, USA.
4. Hahn Kevin A.; Veterinary Oncology, Edit Butterworth-Heinemann, 2002, USA.
5. Kuding Simon T; Seguin Bernard; Veterinary Surgical Oncology; Ed. Wiley-Blackwell, 2012, Oxford UK.
6. Ettinger Stephen J.; Textbook of Veterinary Internal Medicine; Sixth Edition; Elsevier Saunders, 2005,USA.
7. Slatter Douglas; Textbook of Small Animal Surgery; Third Edition Saunders; 2003, USA.
8. Muller Ralf S.; Dermatology for the Small Practitioner; Edit. Teton NewMedia, 2000, USA.
9. Sallie B Cosgrove, Jody A.Wren, Dawn M Cleaver, David D Martin, Kelly F Walsh, Jessica A Harfst, et al; Efficacy And Safety Of Oclacitinib For The Control of Pruritus and Associated Skin Lesions In Dogs With Canine Allergic Dermatitis; *Vet Dermatol*; 24: 479–e114, 2013.
10. Villiers Elizabeth; Blackwood Laura; BSAVA, Manual of Canine and Feline Clinical Pathology, Second Edition, UK, 2007.
11. M. Kiupel; et al; Proposal of a 2-Tier Histologic Grading System for Canine Cutaneous Mast Cell Tumors to More Accurately Predict Biological Behavior; *Veterinary Pathology*; 48(1) 147-155, 2011.
12. Aparna Pali, Arun C. Indamar; Immunohistochemistry: Relevance in Dermatology; *Indian Journal of Dermatology*; 56(6): 629-640, 2011.
13. Hikaru Eto Md, Ken Hashimoto MD, Hitoshi Kobayashi MD, Mitsuro Matsumoto MD, Tamotsu Kanzaki MD, Amir H Mehregan MD, et al; Monoclonal Antikeratin Antibody: Production, Characterization, and Immunohistochemical Application; *The Journal of Investigative Dermatology*; 84:404-409,1985.
14. L. Fuertes, a C. Santonja, b H. Kutzner, c L.; Requena; Immunohistochemistry in Dermatopathology: A Review of the Most Commonly Used Antibodies (Part I); *Actas Dermosifiliogr*; 104(2):99-127, 2013.
15. Xiaoyong Zhang, etl al; Activation Of The Extracellular Signal-Regulated Kinases Signaling Pathway In Squamous Cell Carcinoma Of The Skin; *BioScience Trends*; 1(3):156-160, 2007.
16. AL-Dissi, M. Haines, B. Singh, B A. Kidney; Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Associated with Tumor Cell Proliferation in Canine Cutaneous Squamous Cell Carcinomas and Trichoepitheliomas; *Vet Pathol*; 44:823–830, 2007.
17. de Lima Vazquez Vinicius , et. Al; Prognostic and Risk Factors in Patients with Locally Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Trunk and Extremities; *Journal of Skin Cancer*; Volume, 2011.
18. Xu, Yiru; Baker, Dustin; Receptor Type Protein Tyrosine Phosphatase-Kappa Mediates Cross-Talk Between Transforming Growth Factor-Beta And Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Pathways In Human Keratinocyte; *Mol Biol Cell*; Jan 1, 2010.
19. F. Taylor , S. Murphy , T. Hoather; TSLC1 Tumour-Suppressor Gene Expression In Canine Mast Cell Tumours; *Veterinary and Comparative Oncology*; 8, 4, 263–272
20. Webster, V. Yuzbasiyan-Gurkan, R. A. Miller; Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with C-Kit and its Role in Prognostication; *Vet Pathol*; 44:298–308, 2007.
21. Sonjia M. Shelly; Cutaneous Lesions; *Vet Clin Small Anim*; 33, 1–46, 2003.
22. Sirin Theerawatanasirikul; et al.; Histologic Morphology And Involucrin, Filaggrin, And Keratin Expression In Normal Canine Skin From Dogs Of Different Breeds And Coat Types; *J. Vet. Sci.*; 13(2), 163-170, 2012.
23. S-C Chou, Azuma, MA Varia, JA Raleigh; Evidence that Involucrin, a Marker For Differentiation, is Oxygen Regulated In Human Squamous Cell Carcinomas; *British Journal of Cancer*, 90, 728 – 735, 2004.
24. Kozaki, M, et al.; Immunohistochemical Analysis of Cytokeratin Expression in Dog Skin; *J. Vet. Med Sci*; 63(1):1-4, 2001.
25. S Lippens et al.; Epidermal Differentiation Does Not Involve the Pro-Apoptotic Executioner Caspases, But is Associated With Caspase-14 Induction and Processing; *Cell Death and Differentiation*; 7, 1218-1224, 2000.
26. Wypij Jackie, M.; A Naturally Occurring Feline Model of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; *Pathology Research International*; Volume 2013.
27. Ballegeer et al.; Evaluation Of Hypoxia In a Feline Model of Head and Neck Cancer Using 64cu-Atsm Positron Emission Tomography/Computed Tomography; *BMC Cancer*; 13:218, 2013.

28. Deli Liu et al; Canine Spontaneous Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Represent Their Human Counterparts at the Molecular Level; *PLOS Genetics*, June 1, 2015.
29. Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, 5th Ed ; Saunders Ltd. 2007, Ontario, Canada.
30. Rowell J., McCarthymD., and Alvarez C.; Dog Models of Naturally Occurring Cancer; *Trends Mol Med*, July; 17(7): 380–388, 2011.
31. Alvarez C; Naturally Occurring Cancers in Dogs: Insights for Translational Genetics and Medicine; *ILAR J*, 55(1):16-45, 2014.
32. Patruno Rosa, et al.; C-Kit Expression, Angiogenesis, and Grading in Canine Mast Cell Tumour: A Unique Model to Study C-Kit Driven Human Malignancies; *BioMed Research International*; May (4), 2014.
33. Mederle O ,Mederle N, Bocan EV, Ceaușu R, Raica M.; VEGF Expression in Dog Mastocytoma; *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*;. Jan-Mar; 114(1):185-8, 2010.
34. Bamias A., Dimopoulos M.; Angiogenesis in Human Cancer: Implications in Cancer Therapy; *European Journal of Internal Medicine*; 14, 459– 469, 2003.
35. Cascinu S; Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Can Predict Event-free Survival in Stage II Colon Cancer; *Clinical Cancer Research*; 6, 2803–2807, July, 2000.
36. Semenza G.; Regulation of Cancer Cell Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1; *Seminars In Cancer Biology*; 19,12–16, 2009.
37. Cao Y.; Tumor Angiogenesis and Therapy; *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 59, 340-343, 2005.
38. Gatenby R.; Gillies R.; Why Do Cancers Have High Aerobic Glycolysis?; *Nature Reviews; Cancer*; Volume 4 November, 2004.
39. Folkman J.; Angiogenesis and Apoptosis; *Seminars in Cancer Biology*; 13, 159–167, 2003.
40. Makrilia N.; The Role of Angiogenesis in Solid Tumours: An Overview; *European Journal of Internal Medicine*; 20, 663–671, 2009.
41. Semenza G.; Hif-1: Mediator of Physiological and Pathophysiological Responses to Hypoxia; *J Appl Physiol*; 88: 1474–1480, 2000.
42. Eichhorn M; Angiogenesis in Cancer: Molecular Mechanisms, Clinical Impact; *Arch Surg*; 392:371–379, 2007.
43. Brahim-Horn M.; Chiche J.; Pouysségur J.;Hypoxia and Cancer; *J Mol Med*; 85:1301–1307, 2007.
44. Semenza G.; Hif-1: Upstream and Downstream of Cancer Metabolism; *Current Opinion in Genetics & Development*; 20:51–56, 2010.
45. Mohammadi B.; Haghpanah V., Larijani B.; Astochastic Model of Tumor Angiogenesis; *Computers in Biology and Medicine*; 38, 1007–1011, 2008.
46. Bhat T., Singh R.; Tumor Angiogenesis – A Potential Target in Cancer Chemoprevention; *Food and Chemical Toxicology*; 46, 1334–1345, 2008.
47. Nishida N.; Angiogenesis in Cancer; *Vascular Health and Risk Management*; 2(3) 213–219, 2006.
48. Maneet Bhatia, Therese C. Karlénius, Giovanna Di Trapani and Kathryn F. Tonissen; The Interaction Between Redox and Hypoxic Signalling Pathways in the Dynamic Oxygen Environment of Cancer Cells, Carcinogenesis, Dr. Kathryn Tonissen (Ed.); *InTech*.; 2013.
49. Hong WX; The Role of Hypoxia-Inducible Factor in Wound Healing; *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1; 3(5):390-399, 2014.
50. Hanahan D, Folkman J.; Patterns and Emerging Mechanisms of the Angiogenic Switch During Tumorigenesis; *Cell*, Aug 9;86(3):353-64, 1996.
51. Eri Sasabe, Yukihiro Tatemoto, Dechao Li, Tetsuya Yamamoto and Tokio Osaki Mechanism of HIF-1 α -Dependent Suppression of Hypoxia-Induced Apoptosis in Squamous Cell Carcinoma Cells; *Cancer Sci*; 96 (7):394– 402, 2005.
52. Luay Mousa, Mohamed E. Salem, and Sameh Mikhail; Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer *Biomark Cancer*; 7(Suppl 1): 13–19, 2015.
53. Ryan HE, Poloni M, McNulty W *et al.*; Hypoxia-Inducible Factor-1 α is a Positive Factor in Solid Tumor Growth; *Cancer Res*; 60: 4010–5, 2000.
54. Zhong H, De Marzo AM, Laughner E *et al.*; Overexpression of Hypoxiainducible Factor 1 α in Common Human Cancers and their Metastases; *Cancer Res*; 59: 5830–5, 1999.
55. Erler JT, Cawthorne CJ, Williams KJ *et al.*; Hypoxia-Mediated Downregulation of BID and BAX in Tumors Occurs Via Hypoxia-Inducible Factor 1-Dependent and -independent Mechanisms and Contributes to Drug Resistance; *Mol Cell Biol*; 24: 2875–89, 2004.

56. Taguchi A, Yanagisawa K, Tanaka M, Cao K, Matsuyama Y, et al.; Identification of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha as a Novel Target for miR-17- 92 microRNA Cluster; *Cancer Res*; 68: 5540–5545, 2008.
57. Zhang Lei, Bo Li, Zhuoshun Yang, Haoshu Fang, Gui-Mei Zhang, Zuo-Hua Feng, Bo Huang; Regulation of HIF-1a and VEGF by miR-20b Tunes Tumor Cells to Adapt to the Alteration of Oxygen Concentration; *PLoS ONE*; 4 (10), 2009.
58. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E *et al.*; Hypoxia Inducible Factor (HIF-1 α and HIF-2 α), Angiogenesis, and Chemoradiotherapy Outcome of Squamous Cell Head-and-Neck Cancer; *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 53: 1192–202, 2002.
59. BB Yanping Guo, Shihua Wang, Dahlys R. Hoot, Steven K. Clinton; Suppression of VEGF-mediated Autocrine and Paracrine Interactions Between Prostate Cancer Cells and Vascular Endothelial Cells by Soy Isoflavones; *Journal of Nutritional Biochemistry*; 18:408–417, 2007.
60. Roels S, Tilmant K, Ducatelle R.; PCNA and Ki67 Proliferation Markers as Criteria For Prediction of Clinical Behaviour of Melanocytic Tumours in Cats and Dogs; *J Comp Pathol*; 121:13–24, 1999.
61. M. Vascellari, M. Giantin, K. Capello, A. Carminato, E. M. Morello, A. Vercelli, A. Granato, P. Buracco, M. Dacasto and F. Mutinelli; Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Association With Grading and Prognosis; *Veterinary Pathology*; 50(1) 110-121, 2012.
62. Ishihara M, Mukai H, Nagai S, *et al*; Retrospective Analysis of Risk Factors for Central Nervous System Metastases in Operable Breast Cancer: Effects Of Biologic Subtype And Ki67 Overexpression On Survival; *Oncology*; 84: 135140, 2013.
63. Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, *et al*; Prognostic Impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in Soft Tissue Sarcomas; *PLoS ONE*; 7: 2012.
64. Timothy J. Scase, David Edwards, Jodi Miller, William Henley, Ken Smith, Anthony Blunden, and Sue Murphy, Canine Mast Cell Tumors: Correlation of Apoptosis and Proliferation Markers with Prognosis; *J Vet Intern Med*; 20:151–158, 2006.
65. Lian Tao Li, Guan Jiang, Qian Chen And Jun Nian Zheng; Ki67 is a Promising Molecular Target in the Diagnosis of Cancer (Review); *Molecular Medicine Reports*; 11:1566-1572, 2015
66. Lemmon MA, Schlessinger J.; Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases; *Cell*; 141(7):1117-1134, 2010.
67. Philip Th. Went, Stephan Dirnhofer, Marcel Bundi, Martina Mirlacher, Peter Schraml, Sara Mangialaio, Sasa Dimitrijevic, Juha Kononen, Alessandro Lugli, Ronald Simon, and Guido Saute; Prevalence of KIT Expression in Human Tumors; *J Clin Onco*; 22:4514-4522, 2004.
68. Letard S, Yang Y, Hanssens K, *et al.*; Gain-of-Function Mutations in the Extracellular Domain of Kit are Common in Canine Mast Cell Tumors; *Mol Cancer Res*; 6:1137–1145, 2008.
69. Mery Giantin, Marta Vascellari, Emanuela Maria Morello, Katia Capello, Antonella Vercelli, Anna Granato, Rosa Maria Lopparelli, Chiara Nassuato, Antonio Carminato, Marina Martano, Franco Mutinelli, Mauro Dacasto; c-KIT messenger RNA and Protein Expression and Mutations in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Correlations with Post-Surgical Prognosis; *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*; 24(1) 116– 126, 2012.
70. Welle MM, Rohrer Bley C, Howard J, *et al.*; Canine Mast Cell Tumour: a Review of the Pathogenesis, Clinical Features, Pathology and Treatment; *Vet Dermatol*;19:321–339, 2008.
71. Khodaeiani, Effat *et al.*; Immunohistochemical Evaluation of p53 and Ki67 Expression in Skin Epithelial Tumors; *Indian Journal of Dermatology*; 58(3):181–187, 2013.
72. Nakano T, Ohno T, Ishikawa H, *et al*: Current Advancement in Radiation Therapy for Uterine Cervical Cancer. *J Radiat Res*; 51: 18, 2010.
73. Nazar M.T. Jawhar, Tissue Microarray: A Rapidly Evolving Diagnostic and Research Tool, *Ann Saudi Med*; 2009 Mar-Apr; 29(2): 123–127.
74. Francisco Javier García Vázquez, “Manual Técnicas de Herramientas en Patología, Inmunohistoquímica”, 2014.
75. Kidd Camilla, The Many Challenges of Veterinary Oncology, *The Canadian Veterinary Journal*, 49(11), 2008.
76. Moeller BJ, Cao Y, Li CY, Dewhirst MW; Radiation Activates Hif-1 To Regulate Vascular Radiosensitivity in Tumors: Role Of Reoxygenation, Free Radicals, And Stress Granules; *Cancer Cell*; 5(5):429-41, 2004.
77. Georgina N.Masoud, Wei Li.; Hif-1 α Pathway: Role, Regulation and Intervention for Cancer Therapy; *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5): 378-389, 2015.
78. Xiangming Guan; Cancer Metastases: Challenges And Opportunities; *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 5(5): 402-418, 2015.

79. Hill PB, Lo A., Eden C.A.N., et al.; Survey Of The Prevalence, Diagnosis and Treatment of Dermatological Conditions in Small Animals in General Practice; *Veterinary Record*; 158, 533-539, 2006.
80. Khoshnegah J, Movassaghi A. R., Rad M.; Survey of Dermatological Conditions in a Population of Domestic Dogs in Mashhad, Northeast of Iran (2007-2011); *Veterinary Research Forum*; 4(2): 99–103, 2013.
81. Bostock DE; Neoplasms of the Skin and Subcutaneous Tissues in Dogs and Cats; *British Veterinary Journal*; 142(1):1-19, 1986.
82. Rothwell T.L.W, Howlett C.R., Middleton, D.J., et al.; Skin Neoplasms of Dogs In Sydney; *Australian Veterinary Journal*; 64(6):161-16, 1987.
83. Miller M.A., Nelson S.L., Turk J.R., Pace L.W., et al.; Cutaneous Neoplasia in 340 Cats, *Veterinary Pathology*; 28(5):389-395, 1991.
84. Buerger RG, Scott Dw; Cutaneous Mast Cell Neoplasia In Cats: 14 cases (1975-1985); *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 190(11):1440-1444, 1987.
85. Molander-McCrary H., Henry C.J., Potter K., et al.; Cutaneous Mast Cell Tumors in Cats: 32 Cases (1991– 1994); *Journal of the American Animal Hospital Association*; 34(4): 281-284, 1988.
86. Burrows, A. K., Lee, E. A., Shaw, S. E. et al.; Skin Neoplasms of Cats in Perth; *Australian Veterinary Practitioner* 24:11-15, 1994.
87. Goldschmidt M.H., Shofer F.S.; Skin Tumours of the Dog and Cat; Pergamon Press, 1992, Oxford.
88. Goldschmidt M.H., Bevier D.E.; Skin Tumors in the Dog I, Epithelial Tumors and Tumor Like Lesions; *Compendium on Continuing Education, Small Animal Veterinary Medicine*; 3(5):389-399, 1981.
89. Fingar D.C., Blenis J.; Target of Rapamycin (TOR): An Integrator of Nutrient and Growth Factor Signals and Coordinator of Cell Growth and Cell Cycle Progression; *Oncogene*; 23: 3151–3171, 2004.
90. Roitt I.M.; Essential Immunology; 6th Ed, Blackwell Scientific Publications ; Chicago, USA, 1988.
91. Detmar M; Molecular Regulation of Angiogenesis in the Skin; *Journal of Investigative Dermatology*; 106:207-208, 1996.
92. Yong L.C.J; The Mast Cell: Origin, Morphology, Distribution, and Function; *Experimental and Toxicologic Pathology*, 49(6): 409-424, 1997.
93. Eady R.A.J.; Mast Cell Population Density, Blood Vessel Density and Histamine Content in Normal Human Skin; *British Journal of Dermatology*; 100(6): 623-633, 1979.
94. Dabbous, K.H., Walker M., Haney R.M., Carter L.M.; al.; Mast Cells and Matrix Degradation at Sites of Tumour Invasion in Rat Mammary Adenocarcinoma; *British Journal of Cancer*; 54:459–465, 1986.
95. Parker R.L, Huntsman D.G., Lesack D.W., Cupples J.B., et al.; Assessment of Interlaboratory Variation in the Immunohistochemical Determination of Estrogen Receptor Status Using a Breast Cancer Tissue Microarray; *American Journal of Clinical Pathology*, 117(5):723–728 , 2002.
96. Camp R.L., Charette L.A., Rimm D.L.; Validation of Tissue Microarray Technology in Breast Carcinoma; *Laboratory Investigation*; 80(12):1943-9, 2000.
97. Nocito A., et al.; Tissue microarrays (TMAS) for High Throughput Molecular Pathology Research; *International Journal of Cancer*; 94:1–5, 2001.
98. Farahani N.; Whole Slide Imaging in Pathology: Advantages, Limitations, and Emerging Perspectives; *Pathology and Laboratory Medicine International*; 7: 23–33, 2015.
99. Weinberg R.A., Jacks T.; Cell-Cycle Control and its Watchman; *Nature*; (381):643–644, 1996.
100. Hyun-Ja Jeong, Oh H.A., Nam S.Y., Han N.R., et al.; The Critical Role of Mast Cell-Derived Hypoxia-Inducible Factor-1a in Human and Mice Melanoma Growth; *International Journal of Cancer*; 132: 2492–2501, 2013.
101. Grunstein J., Roberts W.G., Mathieu-Costello O., Hanahan D., Johnson R.S., et al.; Tumor-Derived Expression of Vascular Endothelial Growth Factor is a Critical Factor in Tumor Expansion and Vascular Function; *Cancer Res*; 59, 1592-1598, 1999.
102. McMahon G; VEGF Receptor Signaling in Tumor Angiogenesis; *Oncologist*; 5, 3-10, 2000.
103. Sobczyńska-Rak A.; The Role of VEGF in the Process of Neovasculogenesis; in *Tumor Angiogenesis; InTech* ; Chapter 8, 181-196, 2012.
104. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH.; Hypoxia-Inducible Factor 1 Levels Vary Exponentially Over a Physiologically Relevant Range of O₂ Tension.; *Am J Physiol*; 271(4):1172-80, 1996.
105. Berra E., Benizri E., Ginouvès A., Volmat V., Roux D., et al.; HIF Prolyl-Hydroxylase 2 is The Key Oxygen

- Sensor Setting Low Steady-State Levels of HIF-1 α in Normoxia; *The EMBO Journal*; 22(16):4082-90, 2003.
106. Dewhirst M.W., Ong, E.T., Klitzman, B., Secomb T.W., Vinuya W., et al.; Quantification of Longitudinal Tissue PO₂ Gradients in Window Chamber Tumours: Impact on Tumour Hypoxia; *British Journal of Cancer* (79), 1717–1722, 1999.
 107. Lu J., et al.; The Warburg Effect in Tumor Progression: Mitochondrial Oxidative Metabolism as an Anti-Metastasis Mechanism; *Cancer Lett*; 2014.
 108. Semenza G.L.; Hypoxia-Inducible Factor 1 and the Molecular Physiology of Oxygen Homeostasis; *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* ;131(3), 207-214, 1998.
 109. Meininger C.J, Zetter B.R.; Mast Cells and Angiogenesis; *Semin Cancer Biol*; 3, 73-79, 1995.
 110. Dvorak H.F.; Tumors: Wounds that do Not Heal. Similarities Between Tumor Stroma Generation and Wound Healing; *N Engl J Med*; 315(26):1650-9,1986.
 111. Vaupel P., Mayer A.; Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome; *Cancer Metastasis Rev*;26(2):225-39, 2007.
 112. Brizel D.M., Schroeder T., Scher R.L., Walenta S., et al.; Elevated Tumor Lactate Concentrations Predict for an Increased Risk of Metastases in Head-and-Neck Cancer; *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 1;51(2):349-53, 2001.
 113. Coussens L.M., Raymond W.W., Bergers G., Laig-Webster M., et al.; Inflammatory Mast Cells Up-Regulate Angiogenesis During Squamous Epithelial Carcinogenesis; *Genes Dev*; 13(11):1382-97,1999.
- Cancer Metastasis Rev. 1990 Nov;9(3):203-26.
114. Bashkin P., Vlodavsky I., Korner G., Ishai-Michaeli R., et al.; Extracellular Matrix-Resident Growth Factors and Enzymes: Possible Involvement in Tumor Metastasis and Angiogenesis; *Cancer Metastasis Rev*; 9(3):203-26, 1990.
 115. Vlodavsky I., Benezra M., Bar-Shavit R., et al.; Thrombin Enhances Degradation of Heparan Sulfate in the Extracellular Matrix by Tumor Cell Heparanase; *Exp Cell Res*; 201(1):208-15, 1992.
 116. Reed J.A., Albino A.P., McNutt N.S.; Human Cutaneous Mast Cells Express Basic Fibroblast Growth Factor; *Lab Invest*; 72(2):215-222, 1995.
 117. Potgens, A., Westphal, H., De Waal, R.M.W., Ruiter, D.; The Role of Vascular Permeability Factor and Basic Fibroblast Growth Factor in Tumor Angiogenesis; *Biological chemistry Hoppe-Seyler*; 376(2), pp.57-70, 1995.
 118. Grützkau A., Kruger-Krasagakes S., Baumeister H., Schwarz C.; Synthesis, Storage, and Release of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor (VEGF/VPF) by Human Mast Cells: Implications for the Biological Significance of VEGF; *Molecular Biology of the Cell*; 9: 875– 884,1998.
 119. Mandelker L.; Introduction to Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction; *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*; 38(1):1-30, 2008.
 120. Wang B., Jie Yang J., Bin Xiao B.; MicroRNA-20b (miR-20b) Promotes the Proliferation, Migration, Invasion, and Tumorigenicity in Esophageal Cancer Cells via the Regulation of Phosphatase and Tensin Homologue Expression; *PLoS ONE*; 11(10), 2016.
 121. Deeb G, Vaughan M.M., McInnis I., Ford L.A., Sait S.N., et al.; Hypoxia-Inducible Factor-1 α Protein Expression is Associated with Poor Survival in Normal Karyotype Adult Acute Myeloid Leukemia; *Leuk Res*; 35(5):579-84, 2011.
 122. Evens A.M., Sehn L.H., Farinha P., Nelson B.P., et al.; Hypoxia-Inducible Factor-1 (alpha) Expression Predicts Superior Survival in Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma Treated with R-Chop; *J Clin Oncol.*; 28(6):1017-24, 2010.
 123. Kambayashi S., Igase M., Kobayashi K, Kimura A.; Hypoxia Inducible Factor 1 α Expression and Effects of its Inhibitors in Canine Lymphoma; *J Vet Med Sci*; 77(11): 1405–1412, 2015.
 124. Moschetta M.G., Maschio L.B., Jardim-Perassi B.V., Gelaleti G.B., et al.; Prognostic Value of Vascular Endothelial Growth Factor and Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Canine Malignant Mammary Tumors; *Oncol Rep*; 33(5):2345-53, 2015.
 125. Bostock D.E.; The Prognosis Following Surgical Removal of Mastocytomas in Dogs; *J Small Anim Pract*; 14(1):27-41, 1973.
 126. Bostock D.E., Crocker J, Harris Smith K.; Nucleolar Organiser Regions as Indicators of Post-Surgical Prognosis in Canine Spontaneous Mast Cell Tumours; *Br.J.Cancer*; 59:915-918, 1989.

127. Turrel J.M., Kitchell B.E., Miller L.M., Théon A.J.; Prognostic Factors for Radiation Treatment of Mast Cell Tumor in 85 Dogs; *Am Vet Med Assoc*;15;193(8):936-40, 1988.
128. Gerritsen R.J., Teske E., Kraus J.S., Rutteman G.R.; Multi-Agent Chemotherapy for Mast Cell Tumours in the Dog; *Vet Q.*; 20(1):28-31, 1998.
129. Thamm D.H., Mauldin E.A.; Vail D.M.; Prednisone and Vinblastine Chemotherapy for Canine Mast Cell Tumor 41 Cases (1992-1997); *J Vet Intern Med*; 13(5):491-7,1999.
130. Ayl R.D, Couto C.G, Hammer A.S, Weisbro S.; Correlation of DNA Ploidy to Tumor Histologic Grade, Clinical Variables, and Survival in Dogs with Mast Cell Tumors; *Vet Pathol*; 29:386-390, 1992.
131. Allan G.S., Gillette E.L.; Response of Canine Mast Cell Tumors to Radiation; *J Natl Cancer Inst*; 63:691-694,1979.
132. Simoes J.P., Schoning P., Butine M.; Prognosis of Canine Mast Cell Tumors: A Comparison Of Three Methods; *Vet Pathol*; 31(6):637-47, 1994.
133. Kravis L.D., Vail D.M., Kisseberth W.C., Ogilvie G.K., Volk L.M.; Frequency of Argyrophilic Nucleolar Organizer Regions in Fine-Needle Aspirates and Biopsy Specimens from Mast Cell Tumors in Dogs; *J Am Vet Med Assoc*; 209(8):1418-20 ,1996.
134. Romansik E.M., Reilly C.M., Kass P.H., Moore P.F., London C.A.; Mitotic Index is Predictive for Survival For Canine Cutaneous Mast Cell Tumors; *Vet Pathol*; 44(3):335-41, 2007.
135. Webster, Joshua & Yuzbasiyan-Gurkan, Vilma & Miller, et al.; Cellular Proliferation in Canine Cutaneous Mast Cell Tumors: Associations with c-KIT and Its Role in Prognostication; *Veterinary Pathology*; 44:298-308, 2007.
136. Zemke D., Yamini B., Yuzbasiyan-Gurkan V.; Mutations in the Juxtamembrane Domain of C-Kit are Associated with Higher Grade Mast Cell Tumors in Dogs; *Vet Pathol*; 39(5):529-35, 2002.
137. Bastin K.T., Steeves R.A., Richards M.J.; Radiation Therapy for Squamous Cell Carcinoma in Dystrophic Epidermolysis Bullosa: Case Reports and Literature Review; *Am J Clin Oncol*; 20(1):55-8, 1997.
138. Johnson T.M., Rowe D.E., Nelson B.R, et al; Squamous Cell Carcinoma of the Skin (Excluding Lip and Oral Mucosa); *J Am Acad Dermatol*; 26(3):467-84, 1992.
139. Kramer S., Gelber R.D., et al.; Combined Radiation Therapy and Surgery in the Management of Advanced Head and Neck Cancer: Final Report of Study 73–03 of the Radiation Therapy Oncology Group; *Head and Neck Surgery*; 10(1):19-30, 1987.
140. Wright J.R.; Albert C. Broders' Paradigm Shifts Involving the Prognostication and Definition of Cancer; *Arch Pathol Lab Med*; 136(11):1437-46, 2012.
141. Kumar A., Rao A., Bhavani S., et al.; Automated Analysis of Immunohistochemistry Images Identifies Candidate Location Biomarkers for Cancers; *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 111(51):18249-18254, 2014.
142. Kimbro K.S., Simons J.W.; Hypoxia-Inducible Factor-1 in Human Breast and Prostate Cancer; *Endocr Relat Cancer*; 13(3):739-49, 2006.
143. Scherer S.W., Lee C., Birney E.; Challenges and Standards in Integrating Surveys of Structural Variation; *Nature Genetics*; 39, S7–S15 , 2007.
144. Bruin E., McGranahan N., Swanton C.; Analysis of Intratumor Heterogeneity Unravels Lung Cancer Evolution; *Mol Cell Oncol*; 2(3);, 2015.
145. Rudin C.M., Durinck S., Stawiski E.W.; Comprehensive Genomic Analysis Identifies Sox2 as a Frequently Amplified Gene in Small-Cell Lung Cancer; *Nat Genet*; 44(10): 1111–1116, 2012.
146. Devarakonda S., Morgensztern D., Govindan R.; Genomic alterations in lung adenocarcinoma; *Lancet Oncol*; 16(7):342–351, 2015.
147. Wang Q., Chaerkady R., Wu J.; Mutant Proteins as Cancer-Specific Biomarkers; *PNAS*; 108(6): 2444-2449, 2011.
148. Garm K.L., Pallisgaard N., Rikke Fredslund R., et al; Circulating Free DNA as Biomarker and Source for Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer; *PLOS One*; 10(4), 1-14, 2015.
149. Chen F., Zhang Y., Parra E., Rodriguez J., et al.; Multiplatform-Based Molecular Subtypes of Non-Small-

- Cell Lung Cancer; *Oncogene*; 36(10):1384-1393, 2017.
150. Graves M., Maley C.C.; Clonal Evolution in Cancer; *Nature*; 481:306–313, 2012.
151. Miettinen M., Jerzy L.; KIT (CD117): A Review on Expression in Normal and Neoplastic Tissues, and Mutations and Their Clinicopathologic Correlation; *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*; 13(3):205-220, 2005.
152. Poste G.; Molecular Diagnostics: A Powerful New Component of the Healthcare Value Chain; *Expert Review of Molecular Diagnostics*; 1:1,1-5, 2001.
153. Mimeault M., Batra S.K.; Hypoxia-Inducing Factors as Master Regulators of Stemness Properties and Altered Metabolism of Cancer and Metastasis Initiating Cells; *Journal of Cellular and Molecular Medicine*; 17(1): 30-54, 2013.
154. Yamamoto Y., Ibusuki M., Okumura Y., et al.; Hypoxia-Inducible Factor 1alpha is Closely Linked to an Aggressive Phenotype in Breast Cancer; *Breast Cancer Res Treat*; 110(3):465-75. 2008.

X. Apéndices, Anexos y Gráficas

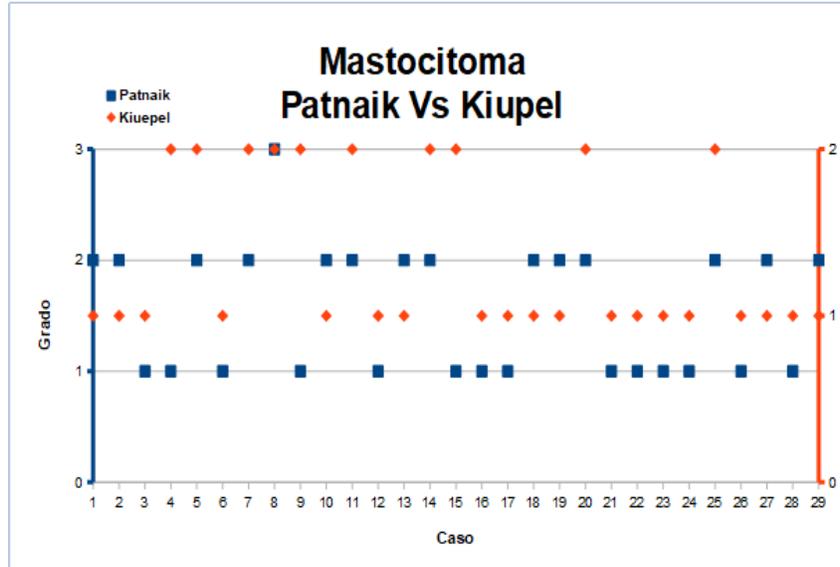
| <u>Enfermedades frecuentes del perro y gato</u> | | | |
|--|-----------------|--------------------------|-----|
| Dermatológicas | 20 a 36.3% | | |
| Digestivas | 29.5% | | |
| Musculoesqueléticas | 14.8% | | |
| <u>Neoplasias</u> | 23.0% | | |
| <i>Dermatológicas</i> | Malignas | Muertes asociadas | |
| 25.5 a 43% | 20 a 40% | Perros hasta | 47% |
| 19.3 a 29.6% | 69.7 a 82% | Gatos hasta | 32% |

Cuadro 1. Enfermedades frecuentes en los perros y gatos. Adaptado de: Dan G, O ; Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England, Neill *PLoS ONE* 9 (3):2014.

Casos Muestreados en el Estudio

| | Casos | Perros | Gatos | Porcentaje |
|--------------------|-----------|--------|-------|------------|
| Mastocitoma | 29 | 29 | 0 | 60.42 |
| CCE | 19 | 13 | 6 | 39.58 |
| Total | 48 | | | 100 |

Cuadro 2. Casos incluidos en el estudio, perros y gatos, 60.42% fueron casos de Mastocitoma, sin presencia de felinos en los casos.



| Patnaik | 1 | 48.3% |
|---------|---|-------|
| | 2 | 48.3% |
| | 3 | 3.4% |

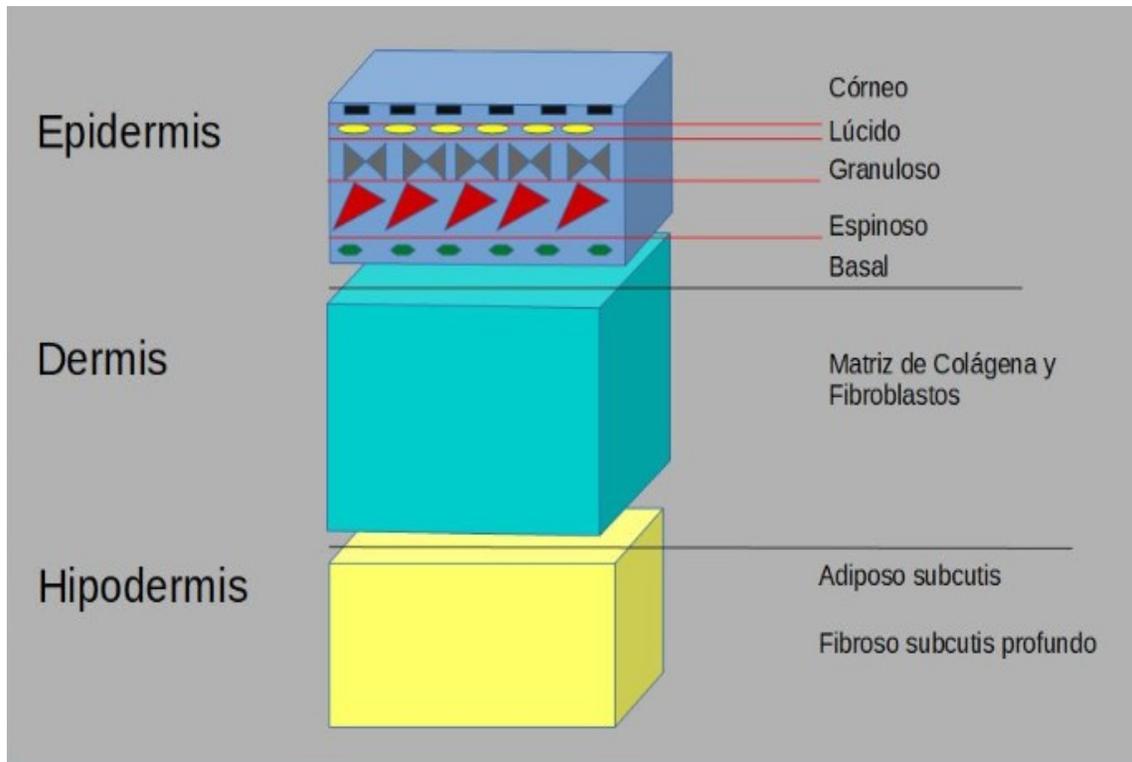
| Kiupel | 1 Bajo | 65.50% |
|--------|--------|--------|
| | 2 Alto | 34.50% |

Cuadro 3. Comparación de los casos de Mastocitoma canino distribuido según el grado sea Patnaik en tres grados (I,II,III) o Kiupel en dos grados (bajo y alto). (Grado Patnaik en el eje de la y (azul) y grado Kiupel en el eje de la y' (naranja), número de caso en el eje de la x)

Distribución de Casos por Especie Carcinoma de Células Escamosas

| Especie | Grado | | | |
|---------|-------|----|---|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | |
| Felino | 2 | 4 | 0 | 6 |
| Canino | 4 | 7 | 2 | 13 |
| | 6 | 11 | 2 | 19 |

Cuadro 4. Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas según el grado en tres, siendo 1 bien diferenciado, 2 moderadamente diferenciado y 3 pobremente diferenciado, en las especies canino y felino.



Esquema 1. Capas de la piel mostrando las divisiones en epidermis como la más superficial, dermis como la intermedia e hipodermis como la más profunda.

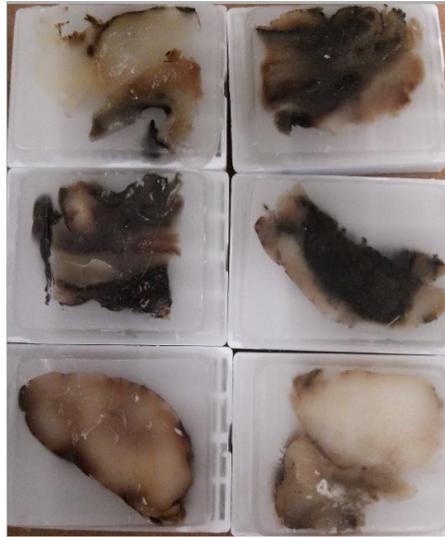


Figura 1. Muestras en parafina de los casos de Mastocitoma, para seleccionar la región a muestrear para los TAM (Microarreglo de Tejidos)

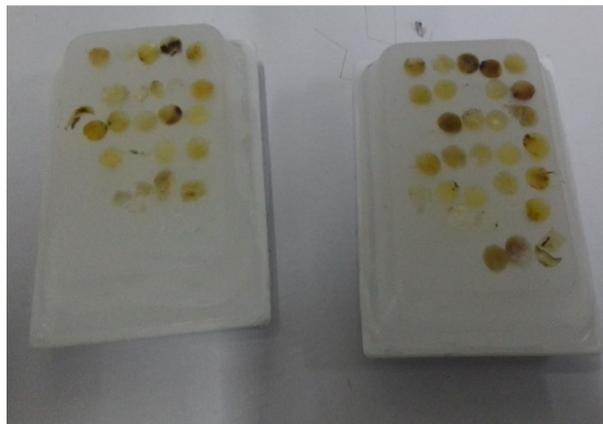


Figura 2. Bloques de TAM (Microarreglo de Tejidos) reparafinados de los tumores Carcinoma de Células Escamosas (izquierdo) y Mastocitoma (derecho).

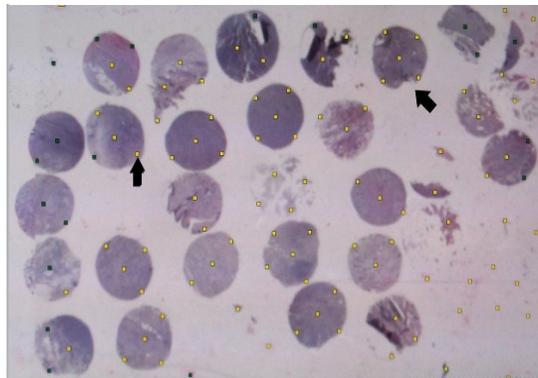


Figura 3. Imagen digitalizada de los TAM (Microarreglo de Tejidos) de los casos de Mastocitoma en el Aperio ImageScope®. La flecha negra indica uno de los puntos (amarillo) que son las áreas de reconocimiento del tejido para realizar un escaneo uniforme.



Figura 4. Laminillas de los TAM (Microarreglo de Tejidos) con los casos de Mastocitoma para ser digitalizadas en el Aperio ImageScope®, colocadas en la gradilla, identificadas con cada biomarcador CD117, Ki67, VEGF, HIF1 α ,

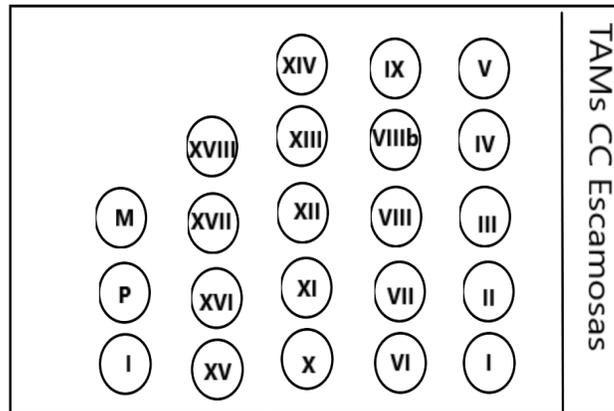


Figura 5. Patrón de las coordenadas de los TAM (Microarreglo de Tejidos) de una laminilla del tumor de Carcinoma de Células Escamosas, para su ubicación posterior ya digitalizada.



Figura 6. Imagen digitalizada de la laminilla de TAM (Microarreglo de Tejidos) con las coordenadas del tumor de Carcinoma de Células Escamosas en el sistema Aperio ImageScope®.

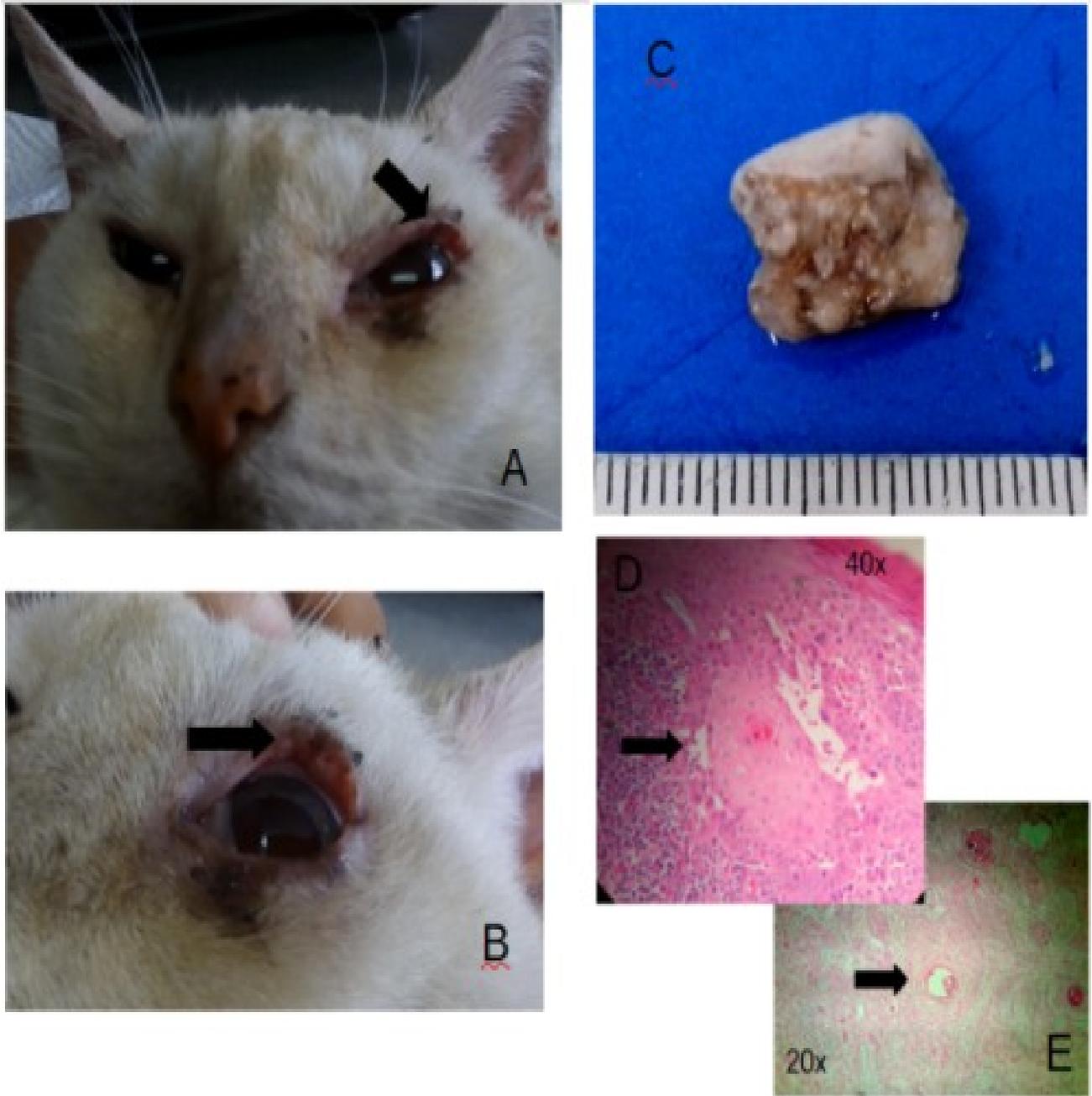


Figura 7. Carcinoma de Células Escamosas en un paciente felino.

A Paciente hembra, europeo doméstico. La flecha negra muestra la masa en el párpado dorsal izquierdo.

B Acercamiento de masa, flecha negra.

C Masa fijada en formol previa al corte.

D y E Tinción Hematoxilina-Eosina a 40x y 20x, las flechas negras muestran nidos de queratina.

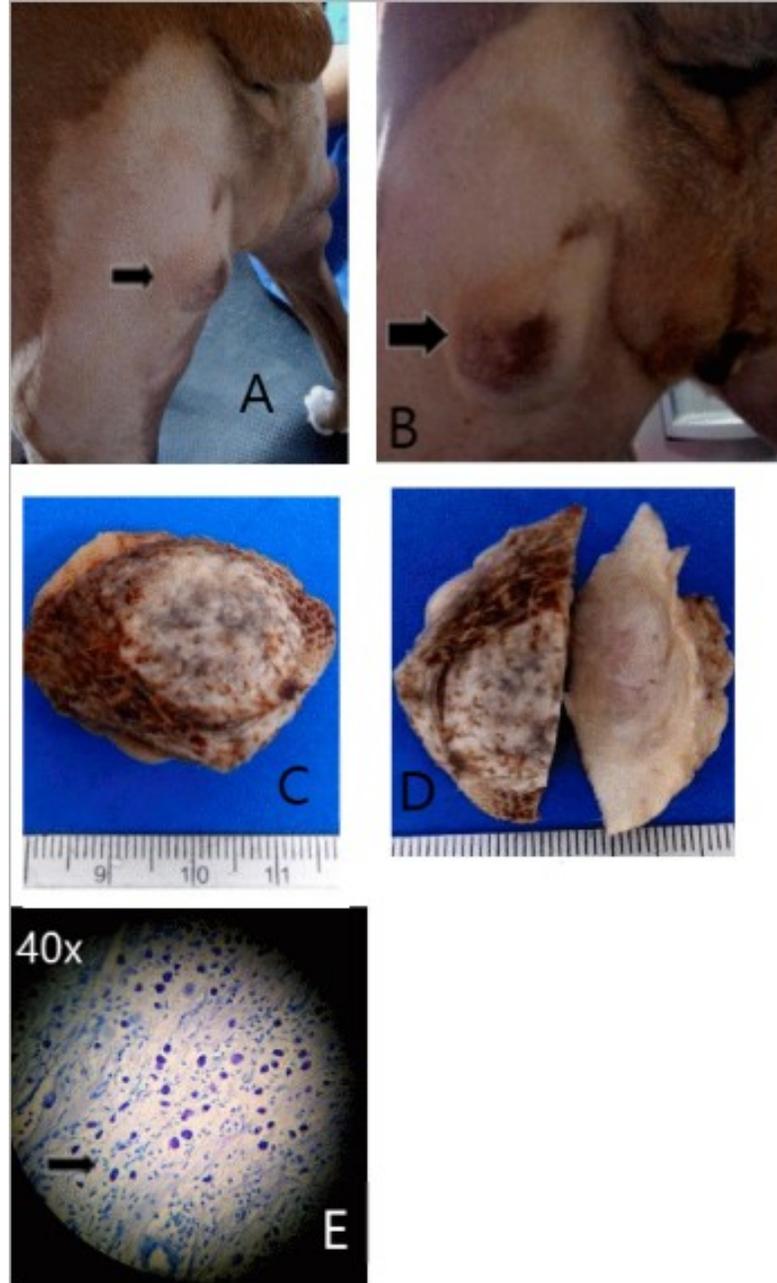


Figura 8. Mastocitoma Canino

A Paciente hembra, boxer, flecha negra masa en miembro pélvico izquierdo.

B Acercamiento de masa, flecha negra vista caudal de paciente.

C Masa fijada en formol previa al corte.

D Masa al corte transversal

E Tinción Azul de Toluidina 40x, flecha negra muestra mastocito con gránulos en su interior, diagnóstico histopatológico de Mastocitoma grado 1 Patnaik, grado Bajo Kiupel.

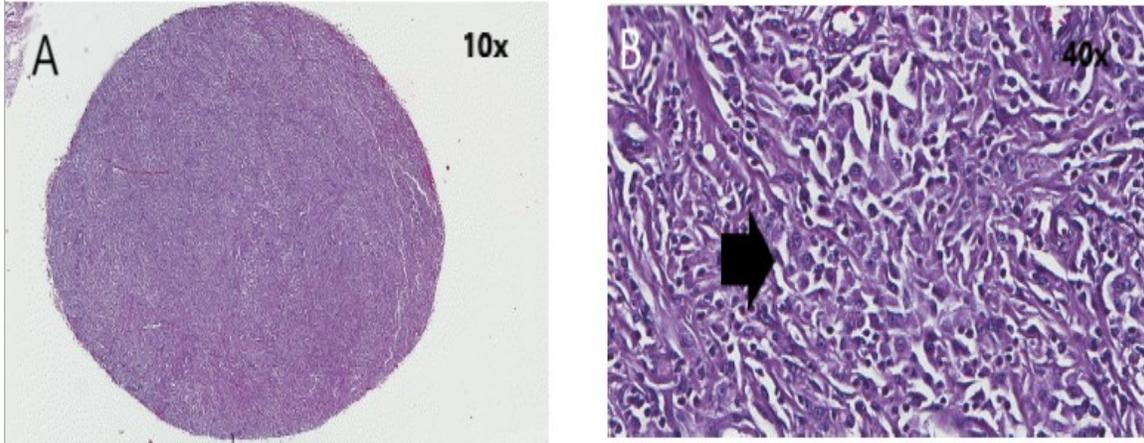


Figura 9. Mastocitoma canino, tinción de Hematoxilina Eosina. **A** Muestra a 10x. **B** Muestra a 40x. Grado I Patnaik, grado bajo Kiupel. Se aprecian mastocitos (flecha negra).

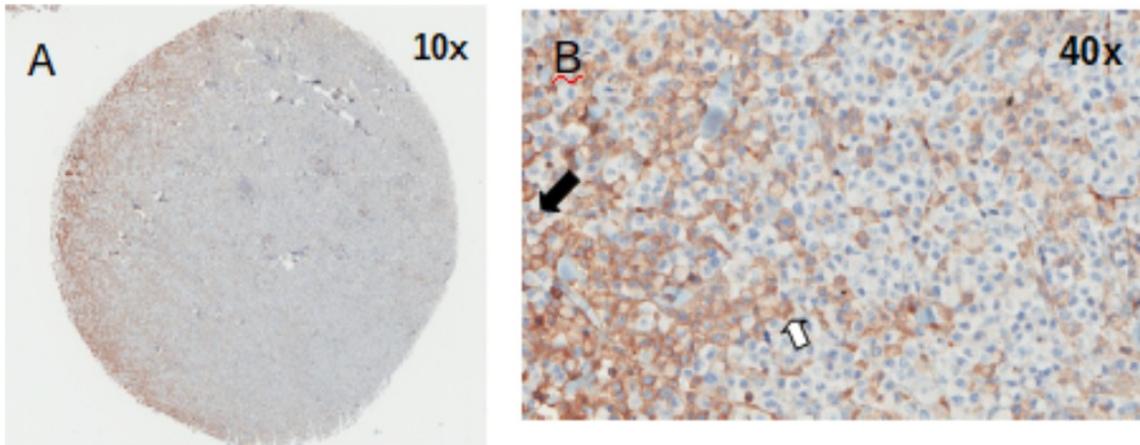


Figura 10. Mastocitoma canino, biomarcador CD117. **A** Muestra a 10x. **B** Muestra a 40x. Localización membranal (flecha negra) y citoplasma difuso (flecha blanca).

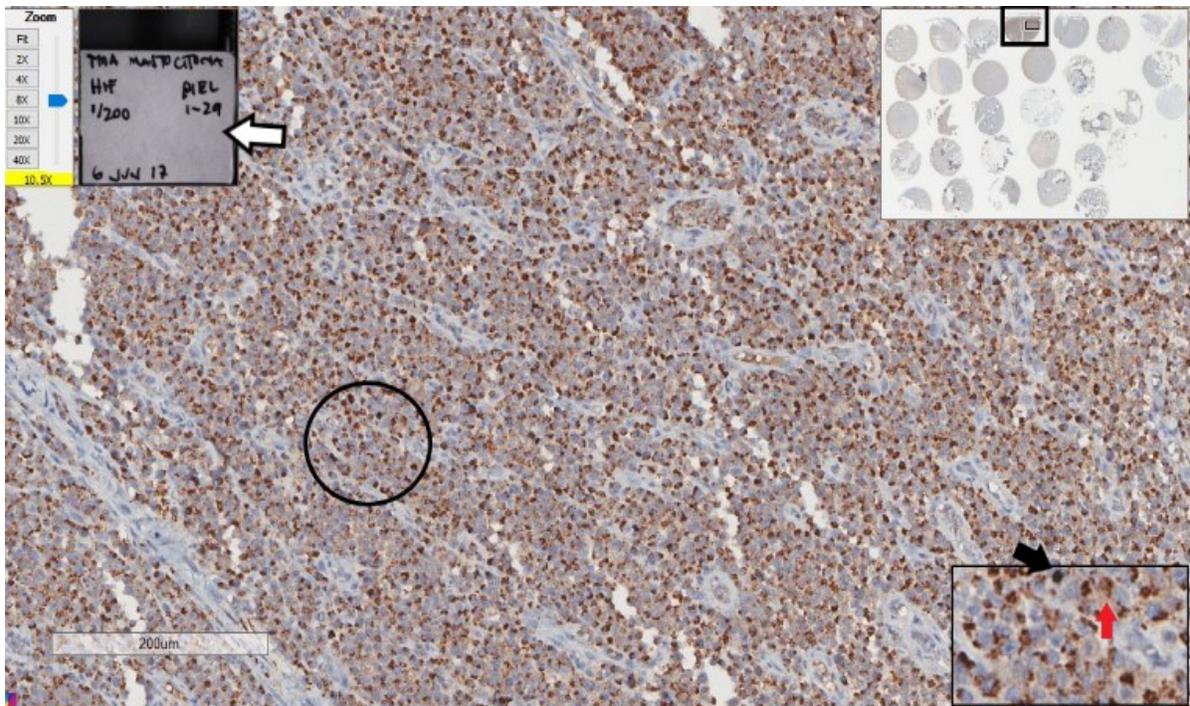


Figura 11. Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcaje HIF1 α positivo de tipo nuclear (fecha negra) y citoplasmático (flecha roja), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

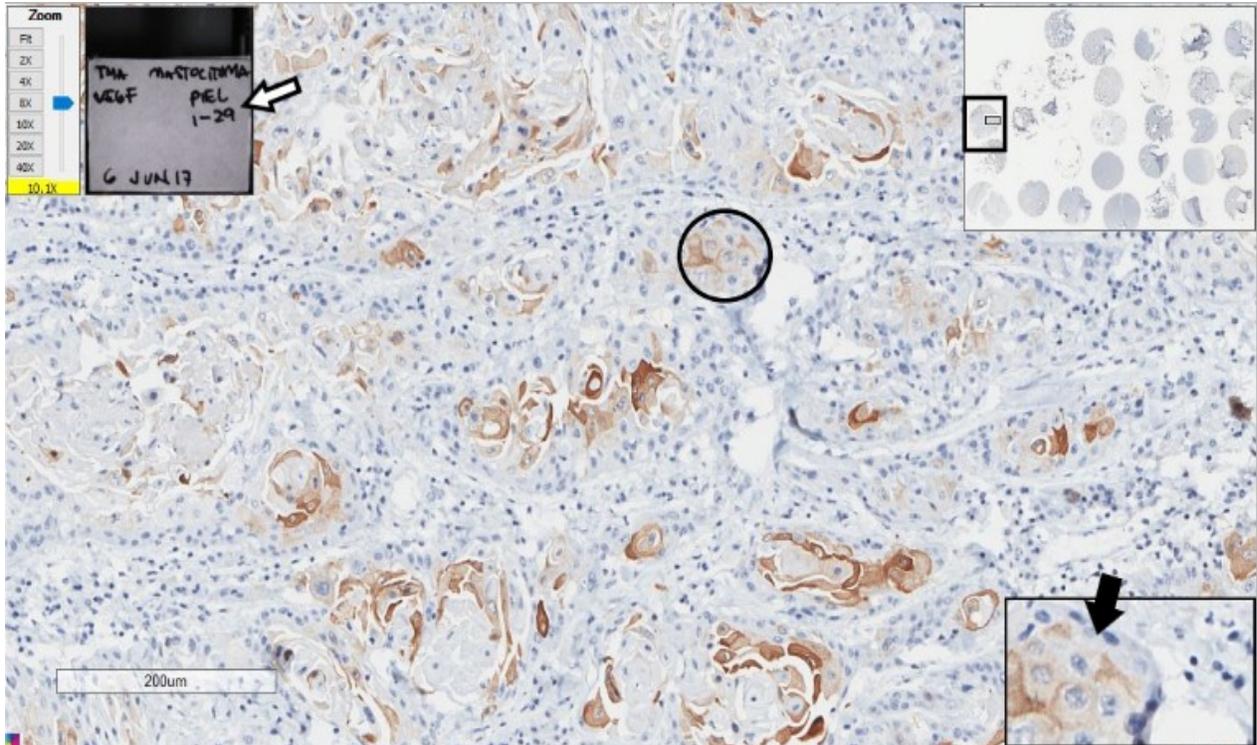


Figura 12. Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcaje VEGF positivo (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

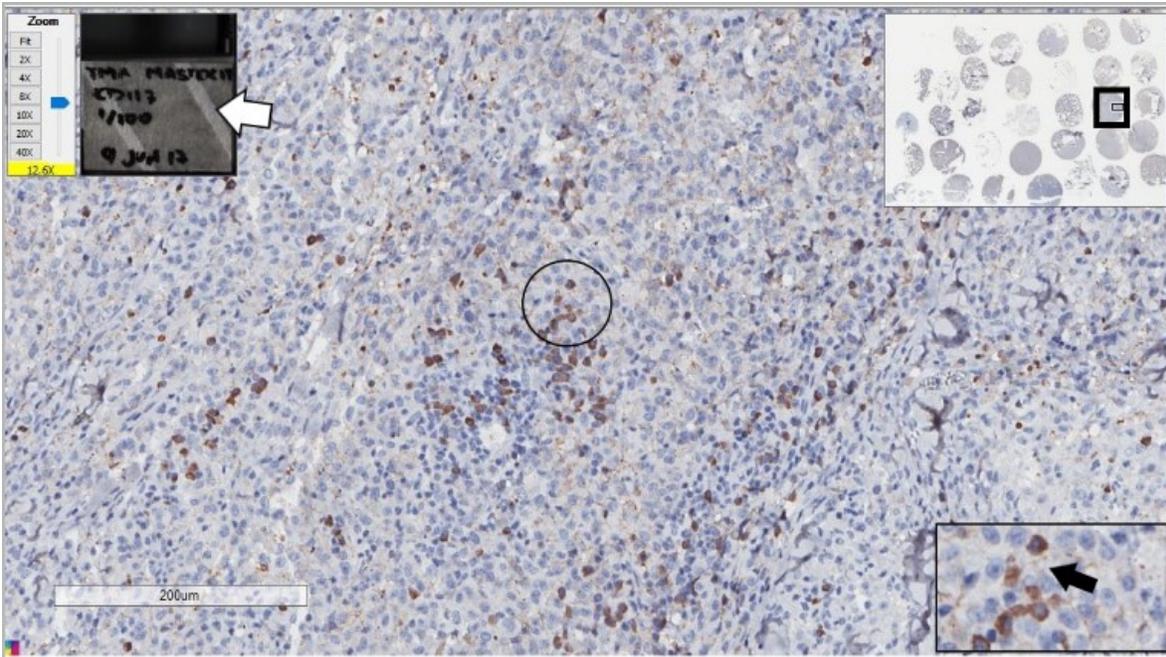


Figura 13. Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcaje CD117 positivo de tipo citoplasmático difuso (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

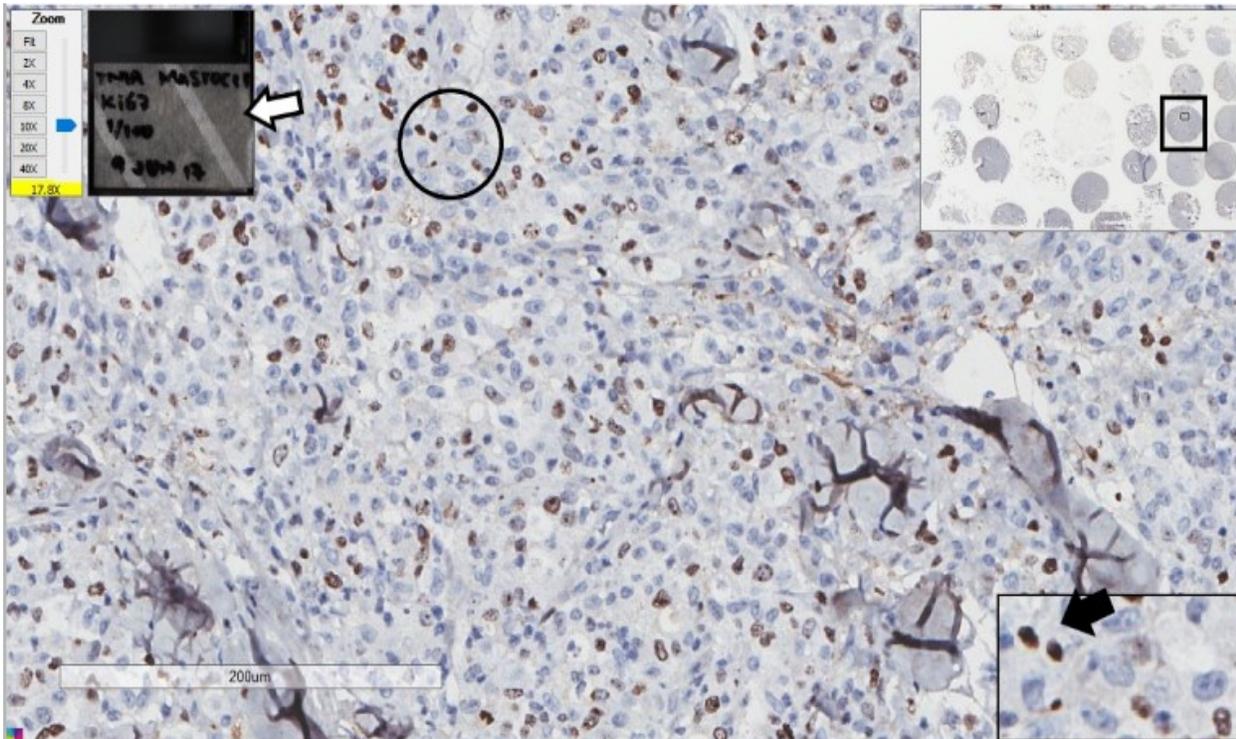


Figura 14. Muestra digitalizada de Mastocitoma canino con biomarcaje Ki67 positivo de tipo nuclear (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

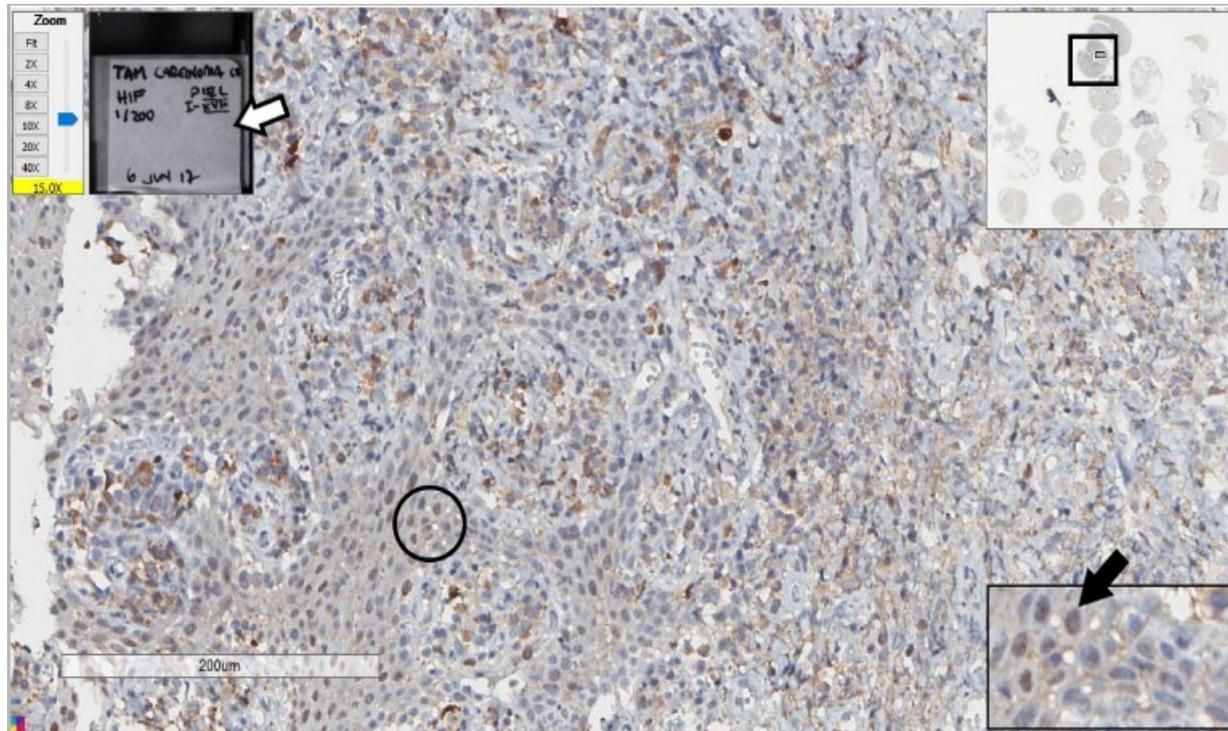


Figura 15. Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcale HIF1 α positivo de tipo nuclear (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

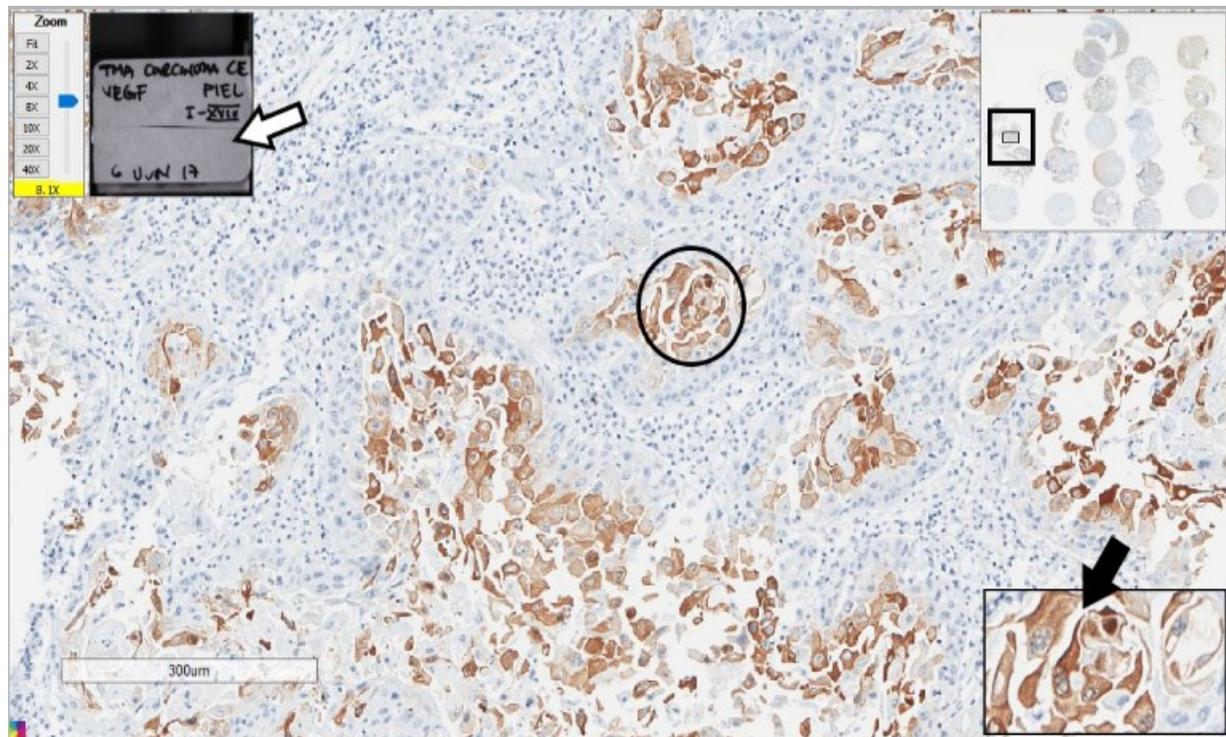


Figura 16. Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcale VEGF positivo (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

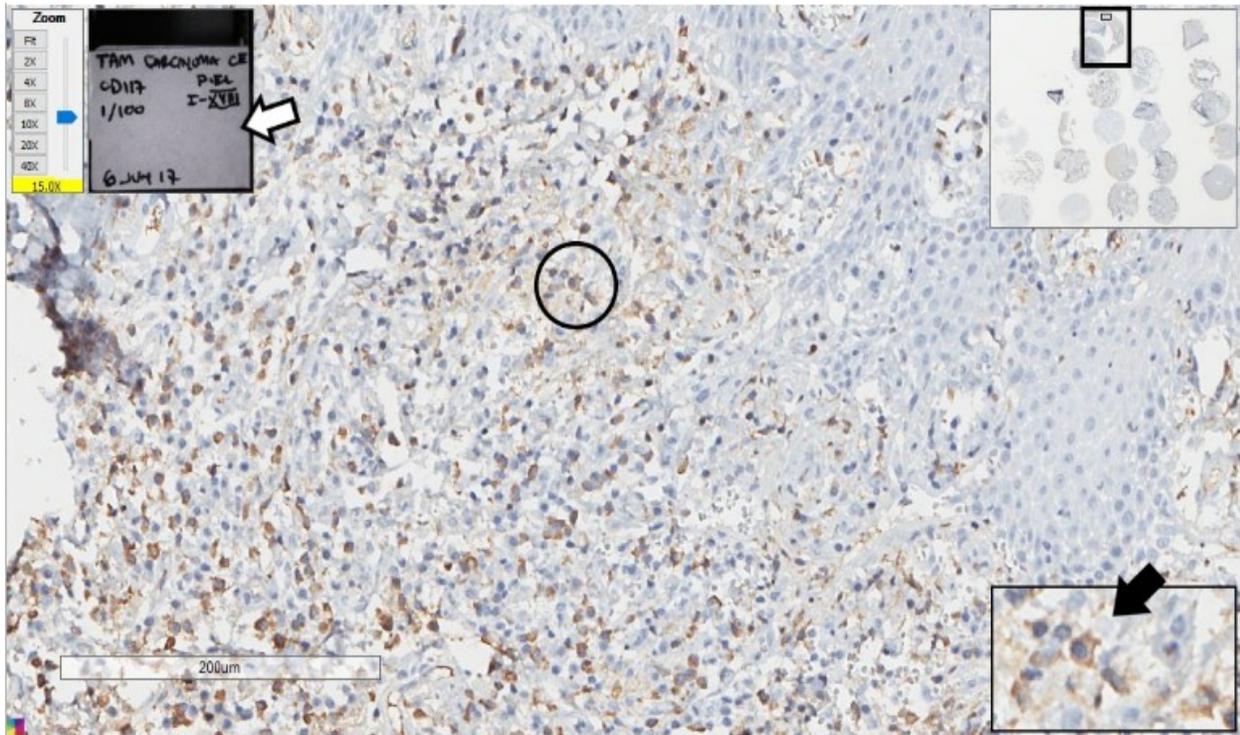


Figura 17. Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcaje CD117 positivo de tipo membranal (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

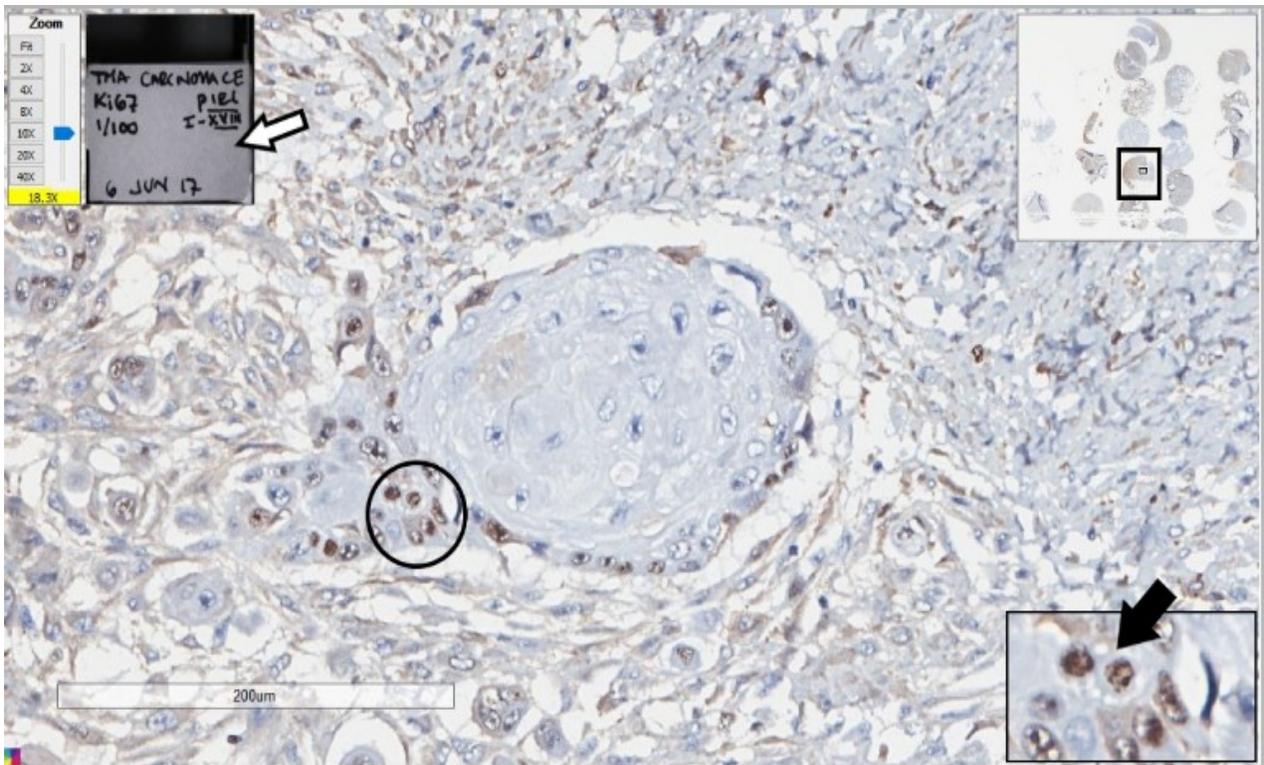


Figura 18. Muestra digitalizada de Carcinoma de Células Escamosas canino con biomarcaje Ki67 positivo de tipo nuclear (flecha negra), etiqueta de identificación (flecha blanca), área de selección (círculo negro), zona seleccionada a mostrar (recuadro superior derecho).

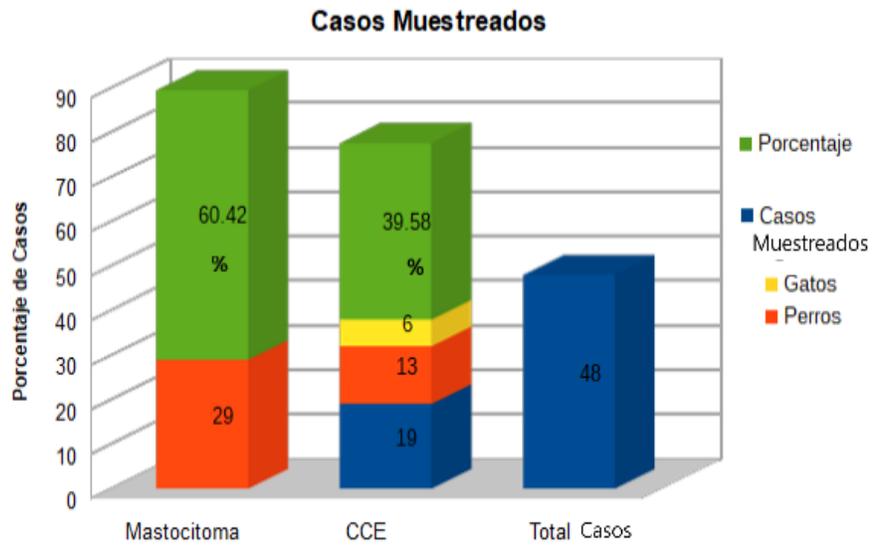


Figura 19. Gráfico de los casos muestreados en el estudio con el total de casos para Mastocitoma y el total de casos para Carcinoma de Células Escamosas. (*Porcentaje de casos en el eje de la y, tumores en el eje de la x*)

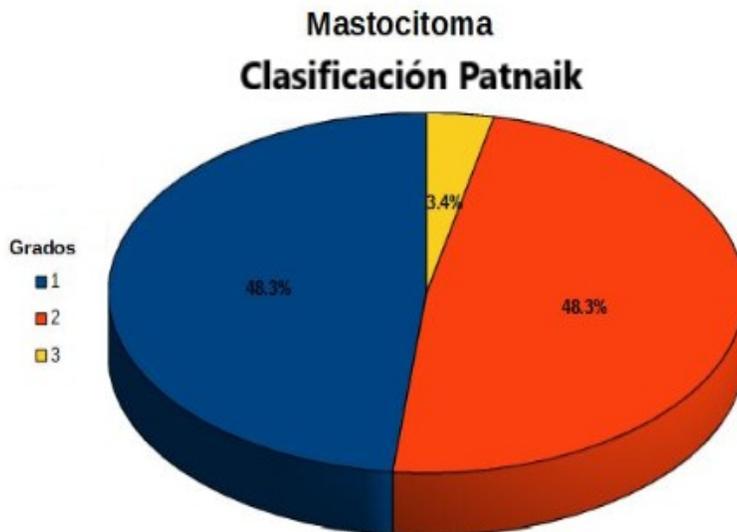


Figura 20. Distribución de los casos de Mastocitoma por grado según la clasificación Patnaik en tres grados, con el grado I y II con el mismo porcentaje de 48.3%.

Mastocitoma Clasificación Kiupel

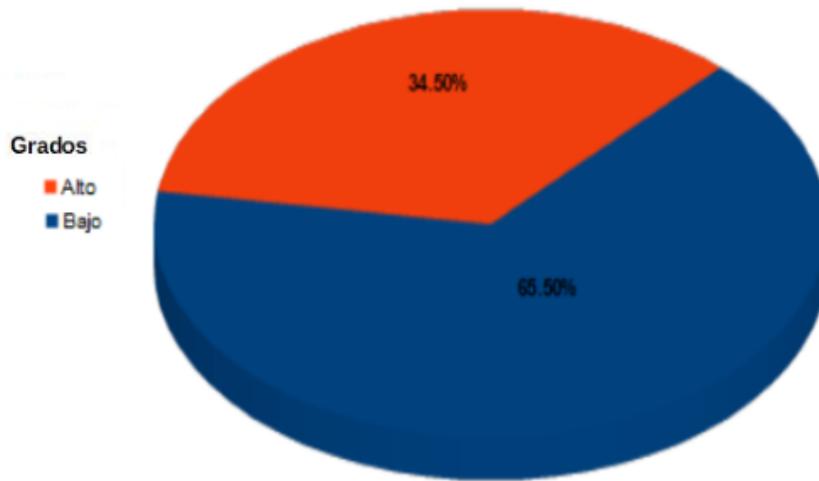


Figura 21. Distribución de los casos de Mastocitoma por grado según la clasificación Kiupel en dos grados, bajo y alto, el grado bajo con el mayor porcentaje con 65.5%.

Clasificación Carcinoma de Células Escamosas

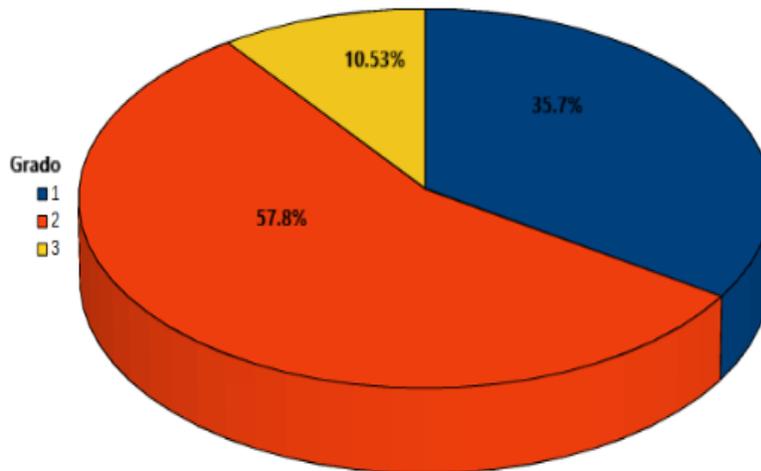


Figura 22. Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas por grado en tres, según el grado de diferenciación celular y arquitectura, siendo el 1 bien diferenciado, el 2 moderadamente diferenciado con el mayor porcentaje con 57.8%, el 3 el poco diferenciado.

Distribución de Casos por Grado Carcinoma de Células Escamosas

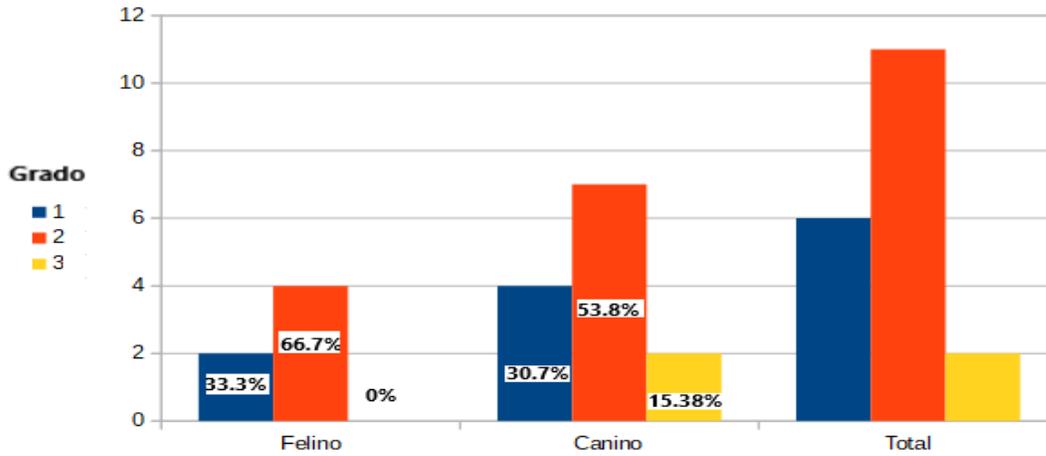


Figura 23. Distribución de los casos de Carcinoma de Células Escamosas por grado según la especie, siendo el 1 bien diferenciado, el 2 moderadamente diferenciado con el mayor porcentaje en ambas especies, felinos (66.7%) y caninos (53.8%) , el 3 el poco diferenciado. (Número de casos en el eje de la y, casos según la especie y el total de ellos en el eje de la x)

Mastocitoma Biomarcadores por Grado Kiupel

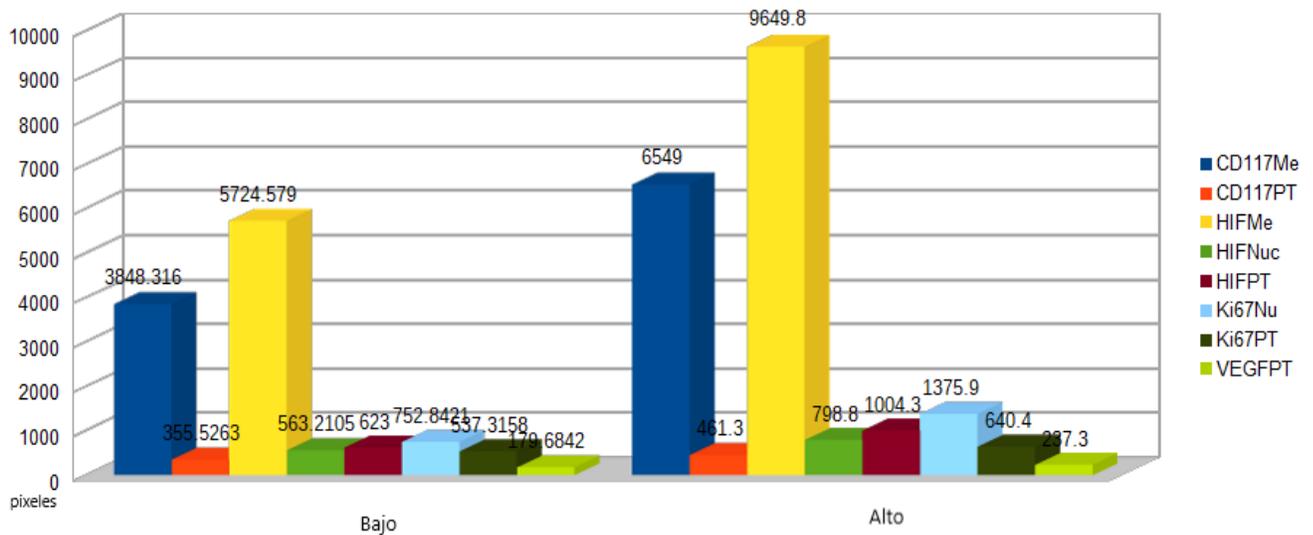


Figura 24. Distribución de los biomarcadores en Mastocitoma según el grado Kiupel con CD117Me y HIFMe con la mayor expresión en píxeles en ambos grados y VEGFPT con la menor también en ambos grados. (Número de píxeles en el eje de la y, biomarcadores según el grado Kiupel bajo y alto en el eje de la x).

Mastocitoma Biomarcadores para Grado Patnaik

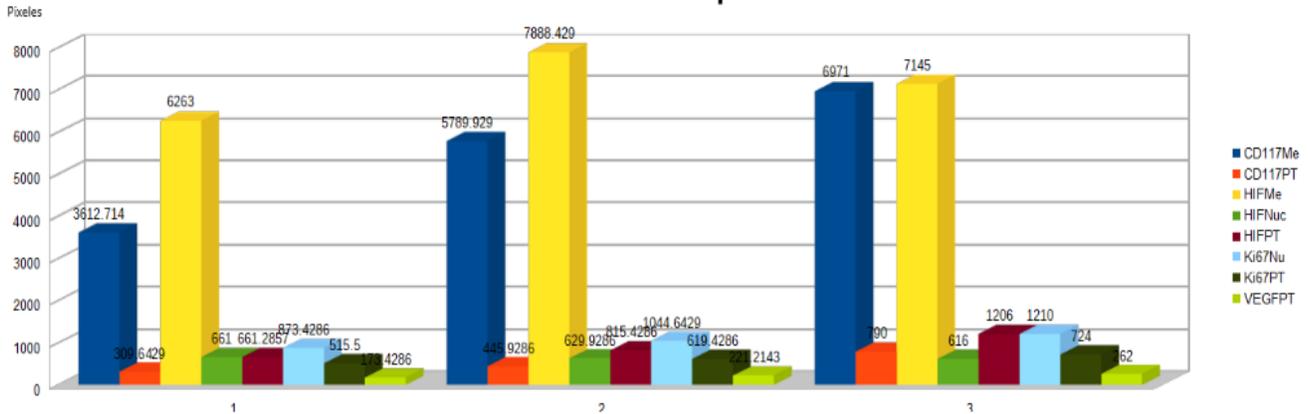


Figura 25. Distribución de los biomarcadores en Mastocitoma según el grado Patnaik con CD117Me y HIFMe con la mayor expresión en pixeles en los tres grados y VEGFPT con la menor también en los tres grados. (Número de pixeles en el eje de la y, biomarcadores según el grado Patnaik 1, 2 y 3 en el eje de la x).

Mastocitoma Grado Patnaik, Desviación Estándar

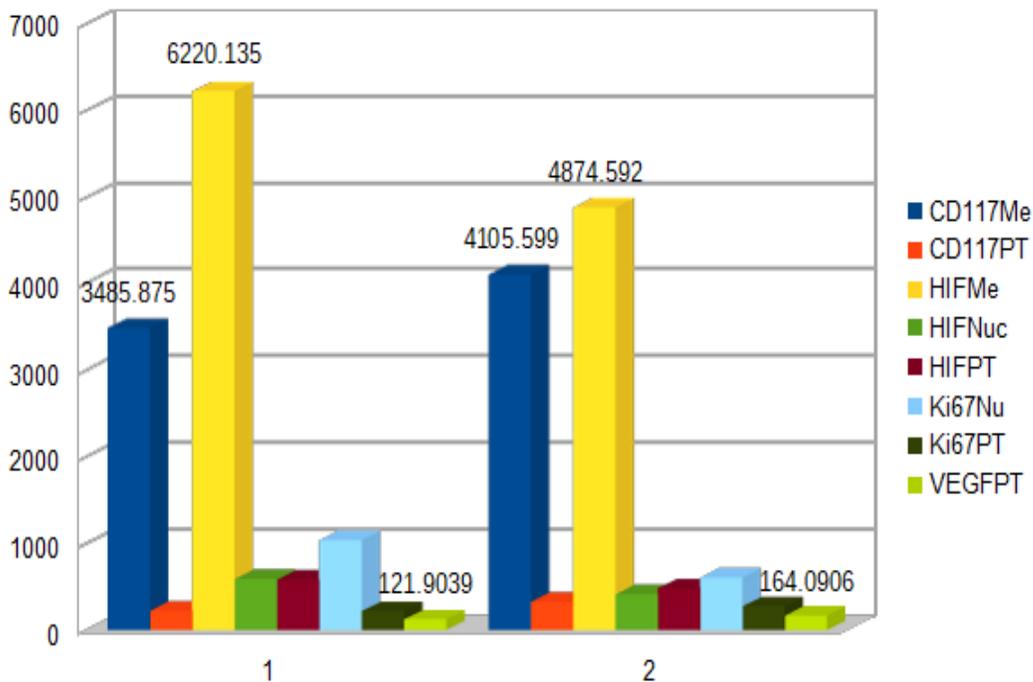


Figura 26. Mastocitoma según el grado Patnaik con las desviaciones estándar más altas en CD117Me y HIFMe en ambos grados y VEGFPT con la menor también en ambos grados. (Número de pixeles en el eje de la y, biomarcadores agrupadas según el grado Patnaik 1 y 2 en el eje de la x).

Mastocitoma Grado Kiupel, Desviación Estándar

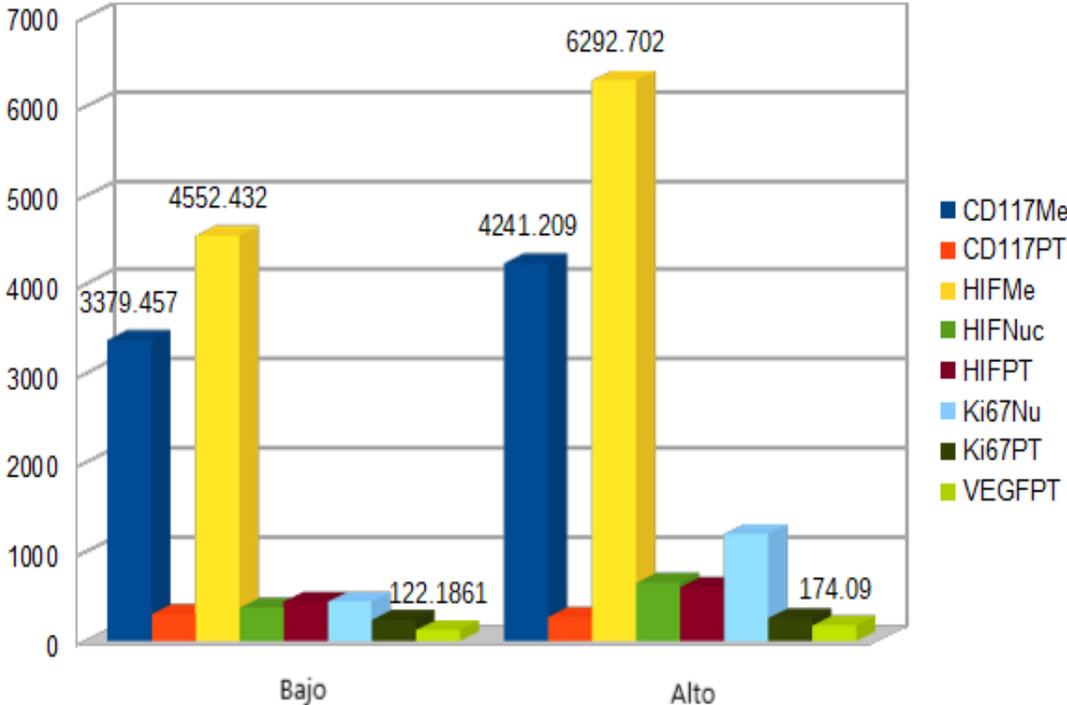


Figura 27. Mastocitoma según el grado Kiupel con las desviaciones estándar más altas en CD117Me y HIFMe en ambos grados y VEGFPT con la menor también en ambos grados. (Número de píxeles en el eje de la y, biomarcadores agrupadas según el grado Kiupel bajo y alto en el eje de la x).

Carcinoma de Células Escamosas Biomarcadores en Gatos

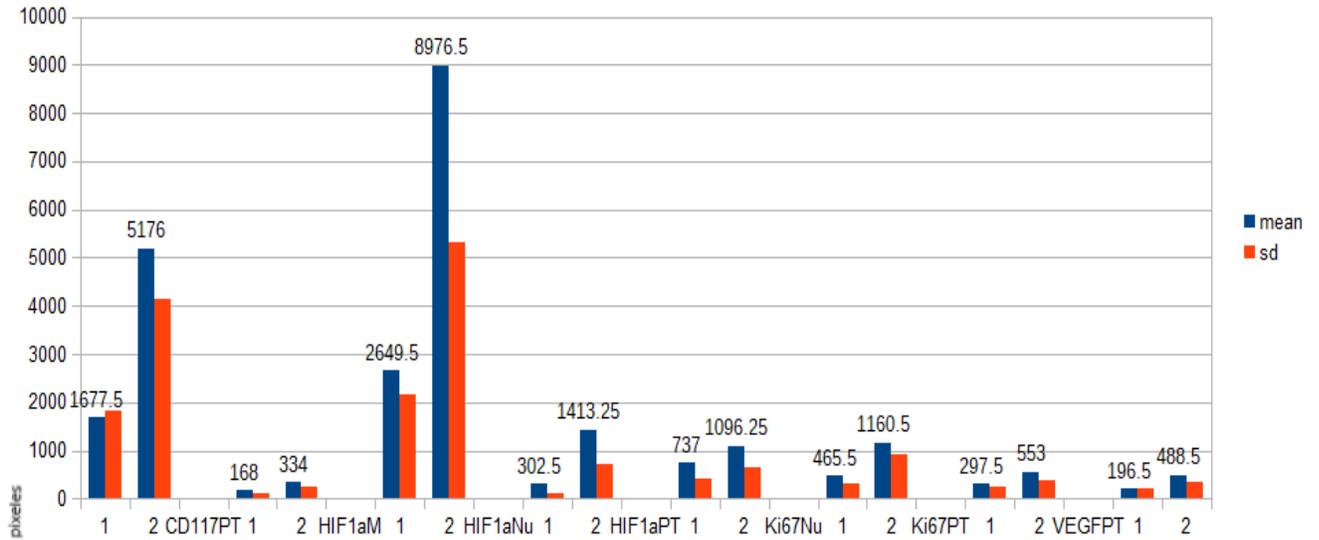


Figura 28. Distribución de los biomarcadores en Carcinoma de Células Escamosas en felinos, según el grado con CD117Me y HIFMe con la mayor expresión en pixeles en los tres grados y CD117PT con la menor también en los tres grados, así como sus desviaciones estándar. (Número de pixeles en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Carcinoma de Células Escamosas Biomarcadores en Perros

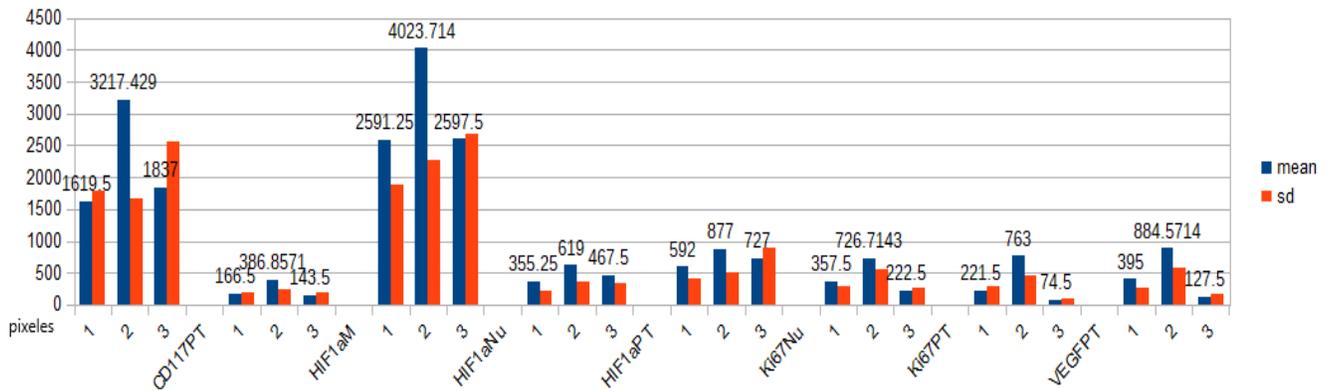


Figura 29. Distribución de los biomarcadores en Carcinoma de Células Escamosas en caninos, según el grado con CD117Me y HIFMe con la mayor expresión en pixeles en los tres grados y CD117PT con la menor también en los tres grados, así como sus desviaciones estándar. (Número de pixeles en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones Mastocitoma grado Patnaik I

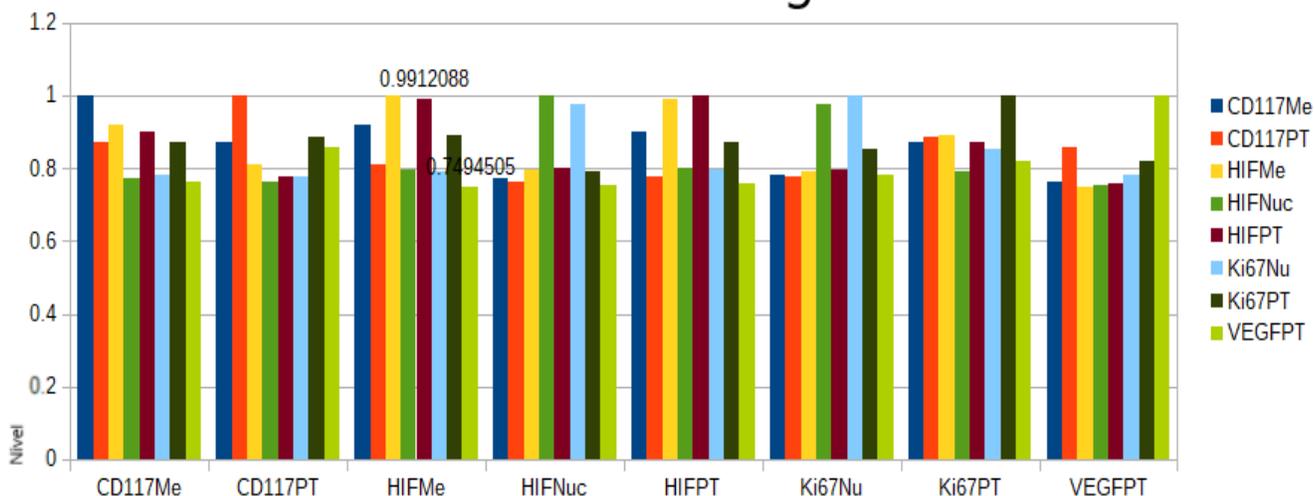


Figura 30. Correlaciones para Mastocitoma según el grado Patnaik I, que entre HIFMe-HIFPT presenta los niveles más altos en 0.99 (muy fuerte asociación) y que entre HIFMe-VEGFPT es el más bajo con 0.74 (fuerte asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones para Mastocitoma Grado Patnaik II

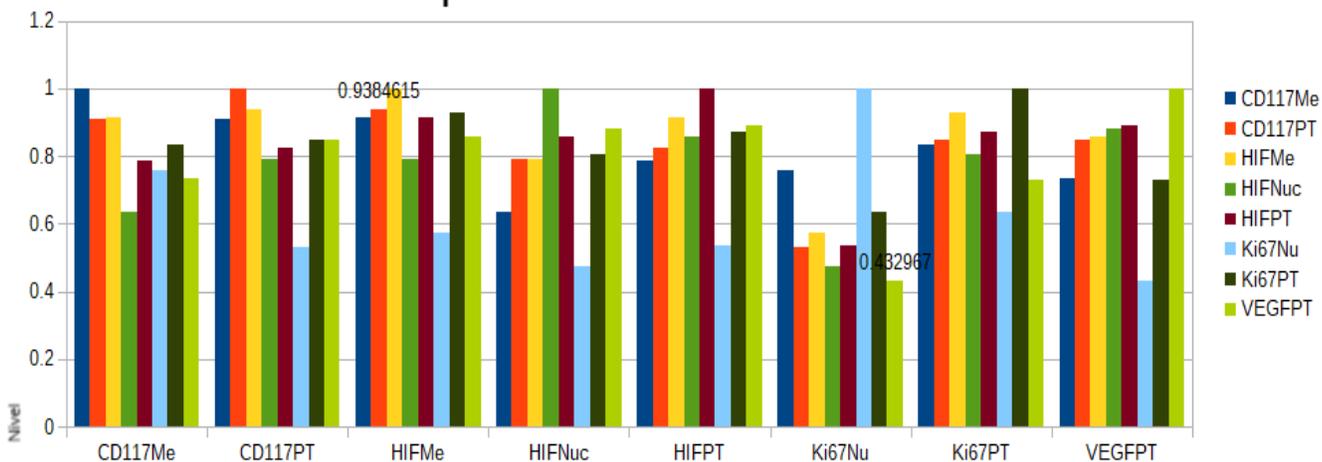


Figura 31. Correlaciones para Mastocitoma según el grado Patnaik II, que entre HIFMe-CD117PT presenta los niveles más altos en 0.93 (muy fuerte asociación) y que entre Ki67Nu-VEGFPT es el más bajo con 0.43 (moderada asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones para Mastocitoma Grado Kiupel Bajo

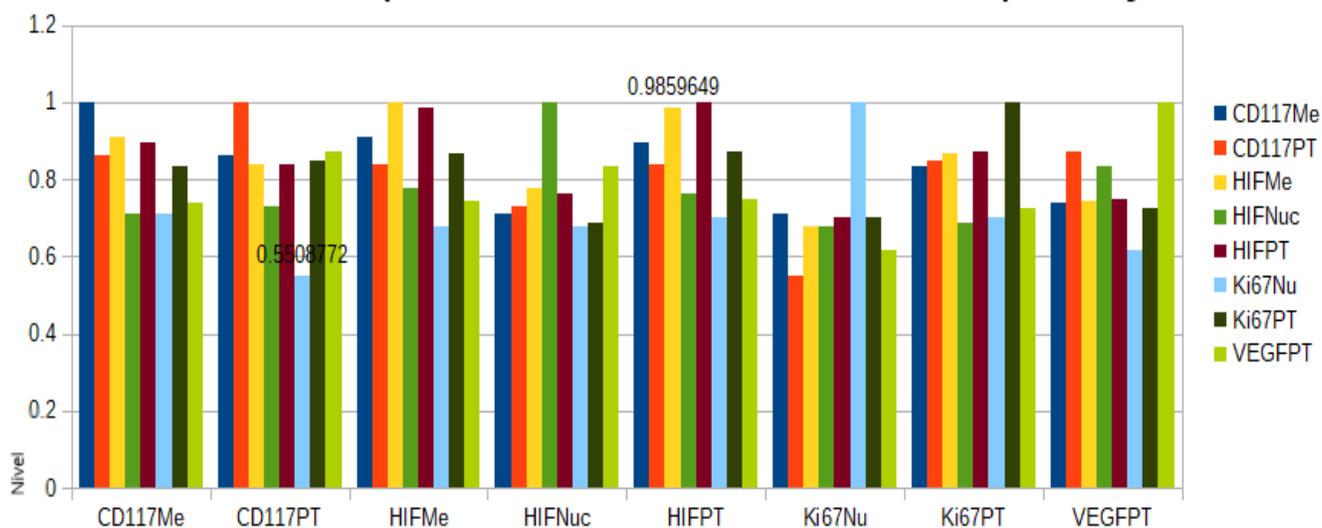


Figura 32. Correlaciones para Mastocitoma según el grado Kiupel bajo, que entre HIFMe-HIFPT presenta los niveles más altos en 0.98 (muy fuerte asociación) y que entre Ki67Nu-CD117PT es el más bajo con 0.55 (moderada asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones para Mastocitoma Grado Kiupel Grado Alto

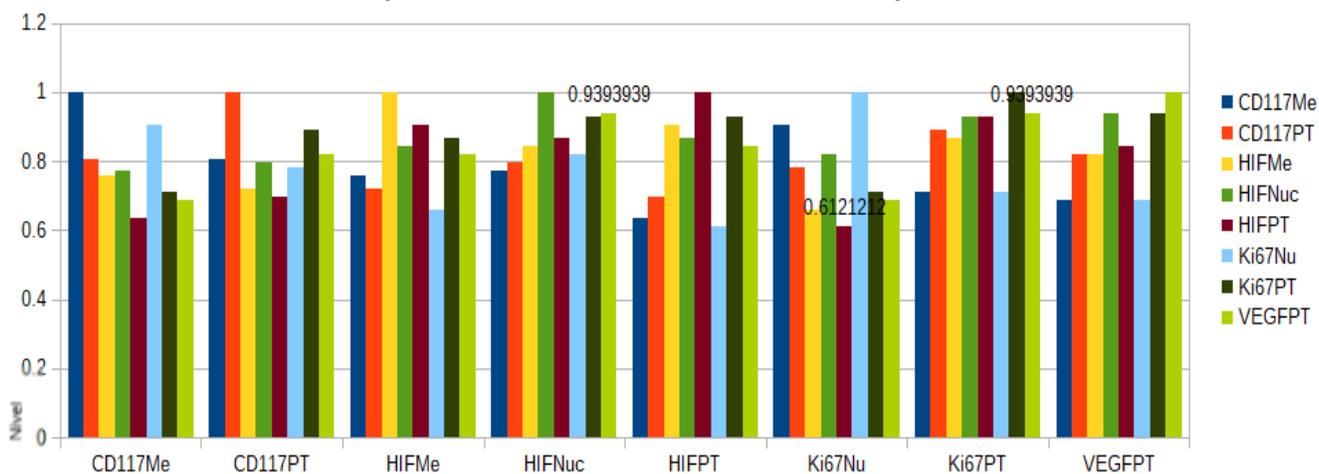


Figura 33. Correlaciones para Mastocitoma según el grado Kiupel Grado Alto, que entre HIFNu-VEGFPT presenta los niveles más altos en 0.93 (muy fuerte asociación) y que entre Ki67Nu-HIFPT es el más bajo con 0.61 (fuerte asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en Perros

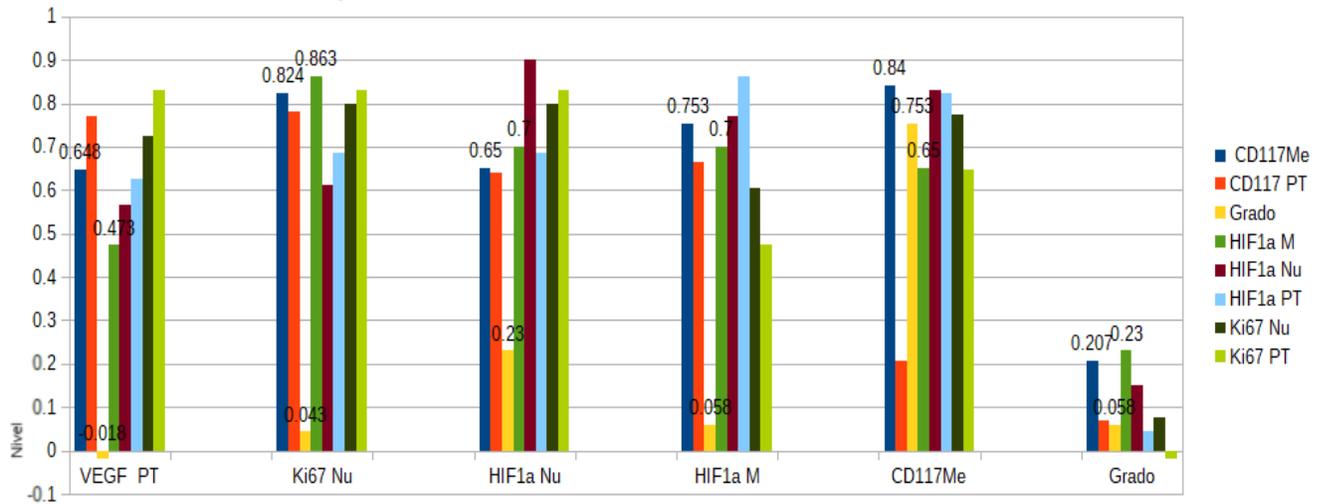


Figura 34. Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en caninos, que entre Ki67Nu-HIFMe presenta los niveles más altos en 0.86 (muy fuerte asociación) y que entre VEGFPT-el grado es el más bajo y negativo con -0.018 (muy pobre asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en Gatos

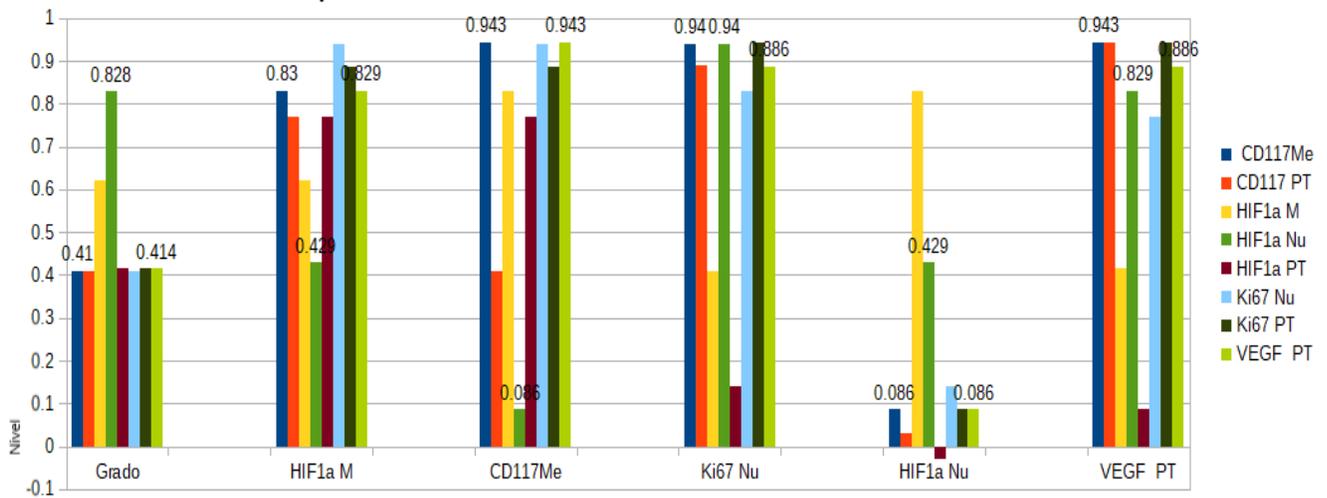


Figura 35. Correlaciones para Carcinoma de Células Escamosas en felinos, que entre CD117Me-Ki67Nu, Ki67Nu-HIFNu y CD117PT-VEGFPT presentan los niveles más altos en 0.94 (muy fuerte asociación) y que entre HIFNu- HIFPT es el más bajo y negativo con -0.029 (muy pobre asociación). (Nivel de asociación en el eje de la y, biomarcadores en el eje de la x)

Abreviaturas y Siglas Usadas

| | |
|----------------|--|
| Ang | Angiopoietin |
| AP -1 | Proteína Activada |
| AgNOR | Regiones de Organización Nucleolar Argiofílicas |
| BFGF | Basic Fibroblast Growth Factor |
| BTNL2 | Butyrophilin Like 2 |
| CEIEPAA | Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano |
| cfDNA | Circulating Cell-Free DNA |
| CDK | Cininas Dependientes Del Ciclo |
| CD117 | Cluster of Differentiation 117 |
| CD117 Me | Cluster of Differentiation 117 Membranal |
| CD117 PT | Cluster of Differentiation 117 Pixeles Totales |
| CD34 | Cluster of Differentiation 34 |
| c-kit | Steel Cell Factor |
| CCE | Carcinoma de Células Escamosas |
| DNA | Deoxyribonucleic Acid |
| DAB | Diaminobenzidina |
| ERK 1/2 | Expresión de la Señal Regulada por Kinasas |
| EGFR | Receptor del Factor de Crecimiento Epitelial |
| FGF | Factor de Crecimiento De Fibroblasto |
| FGFR1OP2 | Fibroblast Growth Factor Receptor Oncogene Partner 2 |
| FMVZ | Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnia |
| FLT-1 | Fms-Like Tyrosine Kinasa-1 |
| FISH | Hibridación In Situ |
| GIT | Gástrica Humana |
| G1 | Activación Mitogénico |
| HIF 1-a | Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha |
| HIF 1-a Me | Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Membranal |
| HIF 1-a Nu | Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Nuclear |
| HGF | Hepatocyte Growth Factor |
| HER4 | Receptor Epidermal Humano |
| IHQ | Inmunohistoquímica |
| KDR | Kinase Insert Domain Containing Region |
| Ki67 | Proteína Histona |
| Ki67 Nu | Proteína Histona Nuclear |
| Ki67 PT | Proteína Histona Pixeles Totales |
| MAS | Músculo Específico de Actina |
| MAPK | Protein Kinasas Activadoras de Mitógenos |
| MMP | Matrix Metalloproteinases |
| mTor | Mammalian Target of Rapamycin |
| M | Mitosis |
| NRP | Receptores de Neuropilin |
| NF- κ B | Factor Nuclear κ B |

| | |
|---------|--|
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PIGF | Placenta Growth Factor |
| PCNA | Antígenos Nucleares de Proliferación Celular |
| PTEN | Phosphatase And Tensin Homolog |
| RPTPK | Receptor de Tirocin Kinasa Kappa |
| RASGRF2 | Ras Protein Specific Guanine Nucleotide Releasing Factor 2 |
| Rb | Retinoblastoma |
| RNS | Reactive Nitrogen Species |
| RNA | Ribonucleic Acid |
| ROBO1 | Roundabout homolog 1 |
| ROS | Reactive Oxygen Species) |
| S | Síntesis DNA |
| SCF | Stem Cell Factor |
| TAM | Micro Arreglo de Tejido |
| TGF-a | Transforming Growth Factor-a |
| TKR | Receptores Tirosina Quinasa |
| USEDICO | Unidad Servicios de Diagnóstico y Constatación |
| UNAM | Universidad Nacional Autónoma de México |
| UV | Ultravioleta |
| Vm | Vimentina |
| VEGFR | Receptor del Factor de Crecimiento del Endotelio |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| VEGF PT | Vascular Endothelial Growth Factor Pixeles Totales |
| VPF | Vascular Permeability Factor |

Anexo 1

Hojas aparte.

X. Agradecimientos

Agradezco a todos los involucrados en la realización de este proyecto, al incansable trabajo y guía del Dr. Gilberto Chávez Gris para mantener el enfoque, seguir en el aprendizaje tanto en la parte científica como en la personal en todo momento, que nunca cesa de buscar nuevos enfoques y más vivencias. A la Dra Guille Baay que siempre impulso ideas que fortalecieron el proyecto y le dieron vida, gracias por el esfuerzo por mejorarlo. Al Dr Francisco García por todo el conocimiento ofrecido de forma tan sincera y el tiempo para aclarar dudas y mantener un ambiente siempre positivo, así como a su grupo de trabajo Arturo y Adán, entre otros. Al Dr. Pedro Ochoa por su atención en los detalles finales. A muchas personas que estuvieron cercanas al proyecto, y que directa o indirectamente ofrecieron su tiempo e ideas, les agradezco ampliamente.

Anexo 1.

Oliver Gamboa Adame

Procedimiento para preparar laminillas electrocargadas

- 1) Preparar poli-L-lisina al 1% utilizando agua destilada.
- 2) Colocar las laminillas dentro de un recipiente con poli-L-lisina y se dejan de 5 a 7 minutos



- 3) Se retiran del recipiente y se tienen dos opciones
 - a) Se dejan 7 minutos a 60 grados centígrados en calor seco
 - b) Se dejan 24 horas a temperatura ambiente.

Nota: Colocar las laminillas en el sujetador para la opción de 7 min e introducirlo en el aparato.



Protocolo para Inmunohistoquímica

Se obtienen cortes de 2 micrometros que son colocados en una laminilla electrocargada.

Nota: Los tejidos conservados en formol y parafina, modifican la estructura tridimensional de las proteínas. el formol crea enlaces cruzados entre las proteínas y la parafina altera su forma. por lo que es necesario seguir estos pasos para la utilización del tejido para el proceso de inmunohistoquímica.

- 1) Colocar las laminillas en el sietador para las mismas e introducirlo en el aparato. Someter a calor seco en la cámara por 30 minutos a 60 grados centígrados.



- 2) Desparafinar colocando las laminillas en el siguiente orden:
 - a) Xilol 5 min
 - b) Alcohol Isopropílico 1 min
 - c) Agua destilada para rehidratación 1 min

- 3) Depende el anticuerpo a usar se elige la solución buffer siguiendo las indicaciones del fabricante para facilitar la recuperación antigénica.

Nota: Este desenmascaramiento revierte los enlaces cruzados por formol y parafina, restaurando los epítopes

Se pueden usar buffers como el Citrato de pH 6.0 o EDTA de pH 8.0

- a) EDTA al 0.1 molar (Preparar con 5 ml de EDTA al 10% con 45 ml de agua destilada)
- b) Citrato al 0.1 molar (Preparar con 5 ml de citrato al 10% con 45 ml de agua destilada)



a) Colocar las laminillas en un vaso de coplin con alguna de las 2 sustancias buffer

- | | | |
|------------|--------|-------|
| 1) Citrato | HIF-1a | Ki67 |
| 2) EDTA | VEGF | CD117 |

b) Al cerrar la tapa del vaso de coplin no debe quedar hermético, así que se debe cerrar suavemente hasta el limite y regresar un octavo de vuelta



4) Para desenmascarar los antígenos utilizar la técnica de recuperación de epítopes inducida por calor para llegar a una temperatura de 100° a 120° utilizando una olla de presión para microondas (Microwave Tender Cooker, Nordic Ware, 8.13"L x 9.5"W x 9.5"H , USA)

a) Precalear la olla 5 min dentro del microondas llenada previamente con 300 a 400 ml de agua destilada.

b) Sacar con precaución y esperar que se pueda abrir al bajar la válvula de seguridad.

c) Colocar el vaso(s) de coplin dentro de la olla y cerrar la olla para colocarla nuevamente dentro del microondas.

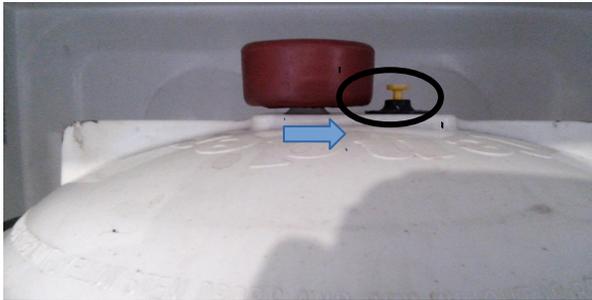
d) Dar tiempo de 5 min, y en el momento que empieza a emitir vapor de manera constante se agrega 1 minuto y 10 segundos.



Nota: La recuperación antigénica ha demostrado un incremento en la intensidad de la tinción y la disminución del fondeado de bastantes marcadores fijado en formalina.

La recuperación por calor con microondas es un factor básico en el proceso, pero el pH de la solución de recuperación es un cofactor necesario en algunos antígenos

- 5) Sacar con cuidado del microondas y esperar que se pueda abrir la tapa, al bajar la válvula de seguridad, acto seguido retirar los vasos de coplin y colocarlos en un recipiente previamente enfriado para permitir que rápidamente regrese a una temperatura ambiente. Se puede usar agua y hielo, se abren las tapas del vaso(s) de coplin. Monitorear que no baje el nivel del buffer que cubre el tejido colocado en las laminillas



- 6) Una vez enfriado se procede al bloqueo de enzimas endógenas (peroxidasa) en orden
- Se lava 2 veces con agua destilada dentro del vaso de coplin
 - Se coloca dentro del vaso de coplin peróxido de hidrógeno al 0.9% por 5 minutos
 - Se da un lavado con agua destilada
 - Se deja en agua para mantener rehidratado

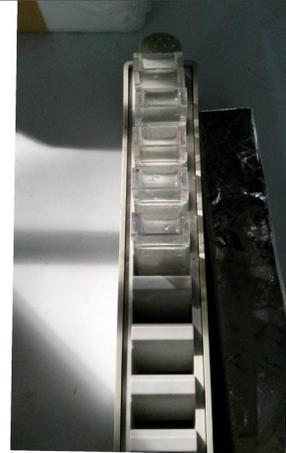
Nota: Si no fuera posible continuar en el momento con la inmunohistoquímica se cambia el agua por PBS y se puede dejar en el hasta que se pueda proseguir horas después



7) Se monta en un rack de capilaridad vertical.

a) Usando PBS se lava el coverplate y se coloca la laminilla sin formar burbujas donde posteriormente es introducido en el rack.

b) Se rellena con PBS evitando la formación de burbujas y se deja 4 minutos para que por capilaridad se mantenga en contacto con el PBS



- 8) Colocar el anticuerpo por capilaridad
a) Utilizar 100 microlitros del anticuerpo en cada laminilla

| | | | | | |
|--------------|--------------|----------|-------|-------|---------|
| Anticuerpo 1 | ___HIF1-a___ | Dilución | 1/200 | Marca | GeneTex |
| Anticuerpo 2 | ___VEGF___ | Dilución | 1/100 | Marca | BioSB |
| Anticuerpo 3 | ___Ki67___ | Dilución | 1/100 | Marca | BioSB |
| Anticuerpo 4 | ___CD117___ | Dilución | 1/100 | Marca | BioSB |

- b) Dejar incubar 45 minutos cubriendo el rack para mantener como cámara húmeda
c) Una vez incubado se lava con PBS en cada laminilla del rack



- 9) Procedes con el uso de polímero HRP MACH1* de BioCare Medical* de dos pasos para amplificar la reacción antígeno anticuerpo.
a) Utilizar 100 microlitros del polímero 1 y esperar 30 minutos
b) Lavar con PBS
c) Utilizar 100 microlitros del polímero 2 y esperar 20 minutos
d) Lavar con PBS
Cubrir en cada paso para mantener la cámara húmeda

Nota: Existen polímeros de 1 solo paso como el Envision* Dako donde el tiempo total es de 35 a 50 minutos



- 10) Para extraer las laminillas del rack se aplica PBS para evitar que se desprenda el tejido de la laminilla y se extrae el coverplate del rack retirando la laminilla.

- 11) Para revelar la reacción se utiliza 3,3 Deaminobencidina (DAB)
La marca Dako se prepara con 50 microlitros de DAB y 100 mililitros del buffer DAB

Nota: El producto es cancerígeno por lo cual debe manejarse con precaución con guantes, lentes de protección y ropa de manga larga.

Una vez preparado:

- a) Se toma la laminilla y con una gasa se seca la parte posterior y alrededor del tejido montado.
- b) Se agrega DAB a la laminilla y se coloca en el microscopio de luz a 10x esperando reacción entre 30 segundos a 1 minuto
- c) Si existe reacción se lava con agua corriente sobre un recipiente con hipoclorito de sodio al 5 o 6% para bloquear el DAB
- d) Se coloca la laminilla en un vaso de coplin con agua para evitar su deshidratación



- 12) Se preparan las laminillas para contraincisión

- a) Usar Hematoxilina colocando 1 gota en la laminilla y esperar 30 segundos
- b) Lavar la laminilla con suficiente agua utilizando una piseta
- c) Colocar 3 a 4 gotas de hidróxido de amonio y esperar 1 a 2 segundos
- d) Lavar la laminilla con suficiente agua utilizando una piseta

- 13) Montar el cubreobjetos

