

**INVASIÓN VASCULAR, EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 2 DEL FACTOR DE
CRECIMIENTO DE ENDOTELIOS VASCULARES (VEGFR-2) Y DENSIDAD DE
MICROVASOS EN CARCINOMAS MAMARIOS DE PERRAS. VALOR PRONÓSTICO**

**VESSEL INVASION, VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 (VEGFR-2)
EXPRESSION AND MICROVESSEL DENSITY IN CANINE MAMMARY CARCINOMAS. PROGNOSTIC
VALUE**

Mónica Elizabeth DIESSLER¹, María Cecilia CASTELLANO², Enrique Leo PORTIANSKY³, Sarah Lilian BURNS⁴, Julio Roberto IDIART⁵.

1-Cátedra de Histología y Embriología, Departamento de Ciencias Básicas; 2-Cátedra de Clínica de Pequeños Animales, Departamento de Ciencias Clínicas; 3-Cátedra de Patología General Veterinaria; 5-Cátedra de Patología Especial, Departamento de Ciencias Preclínicas, Facultad de Ciencias Veterinarias. 4-Laboratorio de Sistemas Ecológicos y Ambientales, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. UNLP. CC 296, La Plata (B 1900 AVW). Argentina.

Autor responsable:

Mónica DIESSLER. Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP. CC 296, La Plata (B 1900 AVW). Argentina.

Tel: 0221-423 6663 x414

e-mail: diessler@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN. Se estudiaron 136 carcinomas mamarios de perras y sus linfonodos satélites por métodos histológicos e histoquímicos con el propósito de evaluar la presencia de émbolos carcinomatosos y la actividad angiogénica del tumor, esta última a través de la identificación de VEGFR-2 (receptor para el factor de crecimiento de endotelios vasculares-2), y del recuento de microvasos. Se estableció la relación entre la presencia de émbolos y la angiogénesis y su repercusión en el estado del linfonodo, factor pronóstico de supervivencia de valor ya demostrado en la especie. Se hallaron diferencias significativas entre las neoplasias con y sin émbolos tumorales con respecto a su capacidad de originar metástasis en los linfonodos. La magnitud de la angiogénesis fue mayor en neoplasias en las que se habían evidenciado émbolos carcinomatosos y/o metástasis.

Palabras claves: caninos, carcinomas mamarios, invasión vascular, angiogénesis, pronóstico.

ABSTRACT. One hundred and thirty six canine mammary carcinomas and their satellite lymph nodes were histological and histochemically studied. The aim of the present work was to assess the presence of carcinomatous emboli and the tumour angiogenic activity, the latter through the identification of VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor -2) and the counting of microvessels. The relation between the presence of emboli and angiogenesis and its impact on the status of the lymph nodes was established. Significant differences were found between tumours with and without emboli and their ability to cause metastasis in the lymph nodes. The extent of angiogenesis was higher in tumours that had demonstrated carcinomatous emboli and / or metastasis.

Key words: canine, mammary carcinomas, vascular invasion, angiogenesis, prognosis.

INTRODUCCIÓN

Los tumores mamarios son las neoplasias espontáneas más comunes en caninos y constituyen más del 50% del total en las perras (1). Entre 40% y 74% de las neoplasias mamarias son malignas (1, 2). El promedio de edad de las pacientes en el momento del diagnóstico oscila entre nueve y diez años y son raras en perras menores de cinco años (1). Son más frecuentes en las razas pequeñas, si bien en estas razas la proporción de neoplasias malignas es menor (3). La mayor parte de las pacientes portadoras son hembras enteras u ovariectomizadas luego del segundo celo. Las mamas abdominales caudales e inguinales, de mayor desarrollo en cada ciclo, son las más propensas a desarrollar neoplasias, las que generalmente son nodulares y pueden ser únicas o múltiples (1).

El estado de los linfonodos (LN) satélites, junto con el tamaño del tumor, son los marcadores pronósticos más relevantes relacionados con la supervivencia, tanto en humanos como en caninos (1,4,5).

La diseminación de los carcinomas ocurre principalmente por vía linfática (4). Aunque el drenaje linfático del tejido mamario canino es complejo, se considera al LN axilar como regional para las mamas torácicas y abdominales craneales, y a los LN inguinal superficial (mamario) e ilíaco medio como regionales para las abdominales caudales e inguinales.

Las metástasis encontradas en los LN derivan (progenie expandida) de las células del tumor primario, luego de un proceso de selección natural. Estas neoformaciones secundarias constituyen, por lo tanto, una fuente de células capaces de metastatizar hacia los pulmones, hígado, riñones, entre otros órganos distantes. La insuficiencia de estos órganos, particularmente de los pulmones (cuyo parénquima se

comprime y/o es reemplazado en distinto grado por las metástasis) causa la mayor parte de las muertes por cáncer y constituye la principal indicación para la eutanasia de las pacientes (4). La mayor parte de las metástasis son diagnosticadas en menos de un año luego del diagnóstico del tumor primario (1).

Otras características de las neoplasias, tales como la invasión de sus vasos por émbolos carcinomatosos y la magnitud de la angiogénesis, podrían ser de utilidad para el pronóstico.

Si bien es relativamente frecuente el hallazgo de émbolos neoplásicos (EN) en vasos peritumorales, su influencia en el desarrollo de metástasis en los LN es motivo de controversia (1, 6, 7). Además, las células tumorales deben evadir la destrucción tumoral inmunomediada, por lo que la mayoría de las mismas tiene poca supervivencia en el torrente sanguíneo (8).

La frecuencia informada de EN en carcinomas mamarios en caninos varía entre 1,6-4:10 (3, 9, 10). No existe consenso con respecto a la relación entre la invasión a los vasos y el pronóstico en esta especie (2), aunque algunos autores observaron correlación entre el hallazgo de EN y la disminución de las probabilidades de supervivencia a 18 y 24 meses (3,10).

La angiogénesis juega un rol central en las neoplasias mamarias, tanto en el crecimiento tumoral como en el desarrollo de metástasis a distancia (11, 12, 13). Para constituir un marcador de valor, este proceso debe estimarse de manera cuantificable y ser reproducible en casos clínicos. Es posible establecer la densidad de microvasos (DMV) de la masa tumoral, considerándolos como producto del fenómeno de angiogénesis, así como medir la expresión de algunos de los factores involucrados en las vías de señalización (factores de crecimiento -GF-, receptores, etc.) (12). El

crecimiento y la progresión tumoral dependen del abastecimiento sanguíneo, ya que ambos procesos están limitados por el acceso a O₂, nutrientes y GF provenientes de la circulación. La red vascular posibilita, asimismo, la eliminación de desechos (8, 14). Por otro lado, esos nuevos vasos aumentan la oportunidad de las células neoplásicas de llegar a la circulación general y alcanzar sitios distantes. Si bien el término "angiogénesis" se usó para describir el crecimiento de brotes vasculares a partir de vénulas poscapilares preexistentes (proceso prácticamente ausente en el organismo adulto en estado de salud), se utiliza en la actualidad de manera más amplia para denotar el crecimiento y remodelación de la red vascular primitiva en una más compleja. La adquisición de la capacidad angiogénica puede ser una expresión de la progresión desde la transformación neoplásica de la población en cuestión hasta su crecimiento y el desarrollo de metástasis (14). Entre los factores proangiogénicos, la familia del factor de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) y sus receptores (VEGFR) es la mejor caracterizada y constituye el foco de la investigación básica y de desarrollo de la industria farmacéutica en el campo de la oncología. Se trata de una familia de glicoproteínas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E y los factores de crecimiento placentarios 1 y 2 (PlGF 1 y 2), consideradas claves en la vasculogénesis y la angiogénesis, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. VEGF se une a sus receptores, de tipo tirosinquinasa, en las células endoteliales y otras células (15, 16, 17, 18). Su síntesis se incrementa fundamentalmente por la hipoxia, acidosis e hipoglucemia. Diversos autores describieron los siguientes receptores para los GF: VEGFR1 o Flt-1 (*fms like tyrosin kinase*), VEGFR2 o KDR (*kinase-insert domain*

containing receptor) o su homólogo murino Flk-1 (*fetal liver kinase*), VEGFR3 (Flt-4) y VEGFR4 (15, 16). Los diferentes receptores se unen a uno o más ligandos, desencadenándose respuestas disímiles (14, 15, 16).

Flk-1 se expresa en endotelios sanguíneos y regula la mayoría de los efectos del VEGF en proliferación, aumento de permeabilidad, invasión, migración y supervivencia celular (9). La ausencia de islotes y vasos sanguíneos en embriones carentes de VEGFR-2 (VEGFR-2^{-/-}) indica que el patrón de señalización que lo involucra es requerido tempranamente en el desarrollo del linaje endotelial (15). Asimismo, se encontró correlación entre la expresión del VEGF y la de su receptor VEGFR-2 (17, 19).

También fue descripta la presencia de Flt-1 y Flk-1 y sus co-receptores (neuropilinas) en las células de tumores, tales como carcinomas pulmonares (excepto el de células pequeñas), próstáticos, mamarios y melanomas y en los vasos adyacentes a los mismos, lo que sugiere que el VEGF podría desempeñar roles adicionales a través de tales receptores mediante comunicación autocrina (9, 17, 18, 19).

La angiogénesis y su relación con el comportamiento biológico de las neoplasias todavía están poco comprendidas en oncología veterinaria. En caninos no se encontró asociación entre la mayor cantidad de vasos y la invasión a los mismos (9). En coincidencia con lo que ocurre en humanos, la sobreexpresión del sistema VEGF/VEGFR está asociada a la progresión en neoplasias mamarias en caninos (12, 16, 19, 20, 21).

La investigación de los desórdenes propios de la carcinogénesis y de la progresión del tumor en los caninos puede aportar conocimientos acerca de la patogenia y de los patrones de comportamiento de las

neoplasias en esta especie, de particular utilidad para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. El objetivo de este trabajo fue establecer la existencia y magnitud de la asociación entre la angiogénesis tumoral y la invasión vascular con el desarrollo de metástasis en los LN.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se analizaron 136 casos de carcinomas mamarios invasivos. Los carcinomas *in situ* fueron excluidos del análisis. El proceso de angiogénesis se estudió mediante inmunohistoquímica (IHQ), midiendo la expresión del VEGFR2 y la DMV. La presencia de EN en las neoplasias y de metástasis en los LN, así como la clasificación histológica de los tumores, se determinó mediante observación de cortes coloreados con hematoxilina-eosina (HE).

Para las técnicas de IHQ se utilizaron cortes de los órganos, montados sobre portaobjetos con cargas positivas (Superfrost plus® A100018, Deltalab). En los casos de neoplasias múltiples, sólo se procesaron mediante IHQ aquellas cuyo tipo y grado histológicos habían sido diagnosticadas como menos diferenciadas. Los cortes fueron procesados mediante la técnica de inmunoperoxidasa con el sistema de detección estreptavidina-biotina con peroxidasa de rábano picante (LSAB2 System, K0673. DAKOCytomation, Carpintería, USA). Para la recuperación antigénica los cortes desparafinados fueron sumergidos en tampón de citrato y calentados en horno de microondas durante dos ciclos de 5 minutos cada uno. Para inhibir las uniones inespecíficas del anticuerpo con el tejido, los cortes fueron cubiertos con leche descremada en polvo comercial, al 4% en solución de tampón de fosfato (PBS), durante 20 minutos. El inmunoprecipitado fue puesto de manifiesto mediante tratamiento con 3,3'-

diaminobencidina (DAB) incluida en el LSAB2 System. En todos los casos, el control negativo de la técnica lo constituyó un corte procesado simultáneamente con aquellos en estudio según el mismo protocolo, a excepción de la incubación con el anticuerpo primario. La reacción positiva se evidenció mediante la coloración parduzca de las zonas conteniendo la proteína buscada. Para estimar la expresión del VEGFR2, el anticuerpo utilizado fue el Flk-1-A/3-: sc-6251 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA), concentración: 1/100. Un corte histológico de tejido corneal fue utilizado como control negativo de la reacción.

Para la cuantificación de la inmunomarcación, se capturaron las imágenes correspondientes a 20 campos de cada uno de los 136 casos, utilizando un objetivo de 40X, mediante una cámara digital (DP71, Olympus, Japón), montada sobre un microscopio (Olympus BX50) y conectada a una computadora. Las imágenes fueron almacenadas con una resolución de 640x480 píxeles, color real (RGB) y formato TIFF, con una relación de 0,32 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Mediante un programa de análisis de imágenes (ImagePro Plus, v6.3, Media Cybernetics) se determinaron los parámetros correspondientes al área y la densidad óptica de marcación de cada imagen analizada (valores mínimos, máximos, promedio, sumatoria, desvío estándar). De la multiplicación de los valores del área y de la densidad óptica se obtuvieron los datos de la densidad óptica integrada (DOI), la densidad óptica integrada/ mm^2 (DOI/ mm^2) y la densidad óptica integrada / máxima intensidad de marcación (DOI/IM). La DOI fue el parámetro utilizado para el análisis comparativo de los datos.

Para estimar la DMV, se inmunomarcaron células endoteliales con el anticuerpo anti-vWf, clon F8/86, M 0616 (Dakocytomation), concentración 1/50. Se realizó

el recuento manual de estructuras marcadas en 20 campos (objetivo 40X), ya fueran microvasos con luz, células, grupos celulares o estructuras en cordón. Los primeros 20 cortes procesados fueron analizados por dos observadores para establecer el criterio de selección de las imágenes a clasificar como "positivas" o "negativas". El resto de los casos fue analizado por un solo observador. Los resultados se expresaron como: elementos positivos por campo de 40 X. Mediante este dato y el de la superficie del campo de observación (0,075 mm²) se calculó el número de elementos por mm², el que fue utilizado para el análisis de los resultados.

Los datos numéricos obtenidos fueron exportados a una planilla de cálculo (SPSS 10.0.1, USA o Microsoft® Excel 2002, USA) para su estudio estadístico. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de t (previo análisis de la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, SPSS). Para la comparación de variables cualitativas se utilizó la prueba de χ^2 (Microsoft® Excel 2002). Para transformar datos cuantitativos en cualitativos, los primeros se agruparon en categorías en función de la mediana (DMV baja/alta). Para determinar la asociación entre variables cuantitativas se obtuvieron coeficientes de correlación de Pearson y Spearman (SPSS). Como análisis multivariado se llevó a cabo el procedimiento de regresión logística múltiple por pasos para seleccionar las variables de valor pronóstico del estado del LN. En todos los análisis, el valor de $P \leq 0,05$ fue considerado como significativo para establecer las diferencias entre poblaciones.

RESULTADOS

Los resultados relacionados con la invasión vascular en forma de EN carcinomatosos, el

compromiso del LN y la angiogénesis de cada tumor se presentan en las tablas 1 a 4. En 40 de los 136 casos estudiados se observaron émbolos neoplásicos (Fig. 1). De estos, 4 no presentaban metástasis en los LN. En 74 casos, se observaron metástasis en el LN (Fig. 2). De estos, la mitad presentaron EN. El *odds ratio* para la

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIM	DMV/campo	DMV/mm ²
1	458,2	152,5	11939	1,52E+08	65,8	1,89	25,3
2	1050,6	154,2	162491	1,54E+08	15,6	8,9	118,7
3	38,2	155,3	5939	1,55E+08	0,6	8	106,7
4	53,3	153,5	8176	1,53E+08	0,8	5,4	72
5	117,6	153,4	18030	1,53E+08	1,8	18,2	242,7
6	592,7	155,6	92237	1,56E+08	8,8	4,6	61,3
7	603,6	154,5	93338	1,55E+08	9	1,9	25,3
8	160,3	154,7	24808	1,55E+08	2,4	11	146,7
9	638,9	156,9	99192	1,57E+08	9,5	4	53,3
10	51,8	155,3	8056	1,55E+08	0,8	3,7	49,3
11	3409,4	156,7	8309	1,57E+08	50	2	26,7
12	12,3	157	1932	1,57E+08	0,2	5	66,7
13	969,8	154	149293	1,54E+08	14,5	2,5	33,3
14	1407,8	158,2	222547	1,58E+08	20,5	2,9	38,7
15	75,5	156,3	11795	1,56E+08	1,1	4	53,3
16	2,8	153,4	400	1,53E+08	0	2,4	32
17	284	154	43704	1,54E+08	4,2	1,7	22,7
18	453,7	154,6	66984	1,55E+08	6,5	8,5	113,3
19	30,3	156,5	4747	1,56E+08	0,4	4,3	57,3
20	6,9	157,8	1089	1,58E+08	0,1	5,8	77,3
21	856,6	155,3	133042	1,55E+08	12,7	14	186,7
22	1	156,1	154	1,56E+08	0	6,2	82,7
23	368,4	157	58020	1,57E+08	5,4	10,4	138,7
24	7,9	156,1	1227	1,56E+08	0,1	7	93,3
25	92,3	156	14395	1,56E+08	1,4	7,3	97,3
26	61,8	155,3	9611	1,55E+08	0,9	5,3	70,7
27	59,6	155,9	9285	1,56E+08	0,9	5,4	72
28	60	155,2	9312	1,55E+08	0,9	1,1	14,7
29	99,2	156	15488	1,56E+08	1,5	8,8	117,3
30	86,7	157	13617	1,57E+08	1,3	6,2	82,7
31	3745,2	156,5	10696	1,56E+08	55,6	1,7	22,7
32	48,5	155,8	7572	1,56E+08	0,7	2,5	33,3
33	38,6	156,2	6034	1,56E+08	0,6	1	13,3
34	428,9	156,3	67040	1,56E+08	6,3	9,3	124
35	155,2	156,1	24287	1,56E+08	2,3	4	53,3
36	50	156,4	7821	1,56E+08	0,7	1	13,3
37	107	155,2	16627	1,55E+08	1,6	4	53,3
38	502,5	155,9	78276	1,56E+08	7,4	7,1	94,7
39	380	155,9	59370	1,56E+08	5,6	4	53,3
40	527,5	156,2	82429	1,56E+08	7,8	2,6	34,7
41	58,1	155,4	9059	1,55E+08	0,9	4	53,3
42	975,7	149,1	146344	1,49E+08	20	9	120
43	105,3	154,4	16243	1,54E+08	1,6	2,2	29,3
44	438,6	155	68106	1,55E+08	6,5	4,5	60
45	203	155,1	31484	1,55E+08	3	2	26,7
46	136,5	154,9	21157	1,55E+08	2	4,4	58,7
47	657,6	156,2	102801	1,56E+08	9,7	4	53,3
48	644,9	155	99994	1,55E+08	9,6	12	160
49	258,5	156,2	40432	1,56E+08	3,8	4,3	57,3
50	285,6	155	44279	1,55E+08	4,2	5,2	69,3
51	227,1	154,6	35068	1,55E+08	3,4	0,2	2,7
52	530,3	156,6	82998	1,57E+08	7,8	4,9	65,3
53	198,5	155,9	30945	1,56E+08	2,9	5,3	70,7
54	172,3	154,9	26659	1,55E+08	2,6	2,8	37,3
55	125,1	155,6	19420	1,56E+08	1,9	4,1	54,7
56	2441,3	155,5	379809	1,56E+08	36,1	6,39	85,3
57	762,8	155,7	118841	1,56E+08	11,3	4,2	56
58	976,2	156,3	152662	1,56E+08	14,4	3	40
Promedio	537,45	155,45	53200,17	1,55E+08	8,07	5,14	68,33
Total casos		58					

Tabla 1. Expresión del VEGFR-2 y de la DMV en las neoplasias sin EN (EN-) y LN negativos (LN-).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área innumerada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIM DMV/campo	DMV/mm ²	
59	180,1	149,7	23940	1.50E+08	2,5	4,7	62,7
60	763,6	156,2	119254	1.56E+08	11,2	14	186,7
61	3216,3	153,2	492600	1.53E+08	48,3	11,1	148
62	190	153,8	29253	1.54E+08	2,8	17,7	236
63	1531,1	154,4	236507	1.54E+08	22,8	7,8	104
64	831,9	154,3	128369	1.54E+08	12,4	13,2	176
65	5162,5	156,2	493323	1.56E+08	46,6	5,9	78,7
66	2675,8	155,2	415403	1.55E+08	39,6	4,2	56
67	2921,5	155,6	455335	1.56E+08	43,1	7	93,3
68	182,5	153,7	28061	1.54E+08	2,7	9	120
69	3634,3	154,4	561383	1.54E+08	54,1	7,1	94,7
70	368,4	157	58020	1.57E+08	5,4	9,1	121,3
71	842,1	155,9	131326	1.56E+08	12,4	3,3	44
72	5948,9	156,2	929148	1.56E+08	87,6	11	146,7
73	889,8	155,1	138068	1.55E+08	13,2	6,5	86,7
74	5528,2	155,8	830835	1.56E+08	78,6	7	93,3
75	4666	156,6	731958	1.57E+08	68,4	11,8	157,3
76	5134,1	156,7	491452	1.57E+08	46	6	80
77	2898,9	153,7	445426	1.54E+08	43,4	6	80
78	1302	155,8	202939	1.56E+08	19,2	7,9	105,3
79	5708,5	156,6	894398	1.57E+08	83,8	4	53,3
80	4342,1	156	676883	1.56E+08	64,1	6	80
81	944,4	156	147327	1.56E+08	13,9	2,1	28
82	761,3	156	118761	1.56E+08	11,2	5	66,7
83	1973,5	157,1	310520	1.57E+08	28,8	2	26,7
84	1230	155,8	191471	1.56E+08	18,2	3,9	52
85	1175	156,7	184075	1.57E+08	17,3	8	106,7
86	4098,7	155,4	636503	1.55E+08	60,7	1	13,3
87	4724,3	156,7	739931	1.57E+08	69,4	3,3	44
88	4381,4	156	684156	1.56E+08	64,5	10,9	145,3
89	2932	155,7	456438	1.56E+08	43,3	14,1	188
90	2676,6	156,1	417850	1.56E+08	39,4	5,1	68
91	2164,6	155,2	335877	1.55E+08	32,1	3,9	52
92	382,5	153,8	95738	1.55E+08	4,6	0,9	12
93	3510,8	155,3	545654	1.55E+08	52	4	53,3
94	3508,1	155,7	545849	1.56E+08	51,9	11	146,7
95	226,4	154,6	35088	1.55E+08	3,4	0,3	4
96	2194,9	156	342177	1.56E+08	32,4	5,2	69,3
Promedio	2410,08	155,57	376349,89	1.58E+08	33,56	6,87	91,58
Total casos	38						

Tabla 2. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias sin EN (EN-) y LN positivos (LN+).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIM DMV/campo	DMV/mm ²	
97	470,2	153,5	72136	1.54E+08	7	6,5	86,7
98	513,9	154,1	48320	1.54E+08	4,7	4,1	54,7
99	236,9	155,5	36853	1.55E+08	3,5	5	66,7
100	2116	155,2	328734	1.55E+08	31,3	4,7	62,7
Promedio	784,25	154,58	121510,75	1.55E+08	11,63	5,08	67,7
Total casos	4						

Tabla 3. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias con EN (EN+) y LN negativos LN (-).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

CASO	ARFA	D	DOI	DOI/mm ²	DOI/AIM DMV/campo	DMV/mm ²	
101	5020,9	155,2	468780	1.55E+08	44,8	11	146,7
102	927,2	155,2	143896	1.55E+08	13,7	4	53,3
103	132,3	154,2	20463	1.54E+08	2	11,5	153,3
104	2113,4	155,7	328784	1.56E+08	31,2	17,1	228
105	527,2	154,8	81640	1.55E+08	7,8	4,5	60
106	2781,7	156,7	435739	1.57E+08	40,8	15	200
107	773,4	155,8	120829	1.56E+08	11,4	5	66,7
108	4168,8	154,5	643343	1.55E+08	62,1	6,2	82,7
109	5434,6	156,9	850979	1.57E+08	79,8	7	93,3
110	6459,3	156,6	1011093	1.57E+08	94,9	8,8	117,3
111	3866,4	154	595951	1.54E+08	57,7	5	66,7
112	2410,5	155,2	373808	1.55E+08	35,8	7	93,3
113	1137,9	155,3	176643	1.55E+08	16,9	3	40
114	3656,8	153,9	562741	1.54E+08	54,7	1,4	18,7
115	4340,4	155,5	675213	1.56E+08	64,2	7	93,3
116	6865,2	155,8	1069427	1.56E+08	101,4	9	120
117	277,3	161,5	44975	1.61E+08	3,9	5,2	69,3
118	5128,8	156	799216	1.56E+08	73,7	5,2	69,3
119	2163,9	156,3	337676	1.56E+08	31,9	5	66,7
120	3108,4	155,9	483633	1.56E+08	46	7,6	101,3
121	917,2	155,9	142970	1.56E+08	13,5	9,3	124
122	5833,1	156,6	912311	1.57E+08	85,8	10	133,3
123	2584,4	156,4	404472	1.56E+08	38	7,5	100
124	4680,5	156	729946	1.56E+08	69	18	240
125	3499,5	156,3	546982	1.56E+08	51,5	5,2	69,3
126	2904,7	155,7	452051	1.56E+08	42,9	9	120
127	5430,7	155,9	846389	1.56E+08	80,1	8,2	109,3
128	5098	155,9	795041	1.56E+08	73,2	9,9	132
129	4619,7	156,5	723148	1.56E+08	67,9	1,7	22,7
130	2786	156,3	436267	1.56E+08	40,9	2,1	28
131	195,3	154,1	30077	1.54E+08	2,9	0,5	6,7
132	5875,3	155,6	914166	1.56E+08	86,9	9	120
133	5364,3	155,2	832365	1.55E+08	79,5	11,8	157,3
134	1676,8	156,1	261693	1.56E+08	24,7	18	240
135	3121,5	155,5	485170	1.56E+08	46,2	6,4	85,3
136	3728,3	156,5	584255	1.56E+08	54,7	14,2	189,3
Promedio	3266,99	155,82	508948,11	1.56E+08	48,23	7,95	106,03
Total casos	36						

Tabla 4. Expresión del VEGFR-2 y DMV en las neoplasias con EN (EN+) y LN positivos (LN+).

VEGFR-2: receptor 2 del factor de crecimiento de endotelios vasculares; DMV: densidad de microvasos; EN: émbolos neoplásicos; LN: linfonódulo; D: densidad; DOI: densidad óptica integrada; AIM: área inmunomarcada.

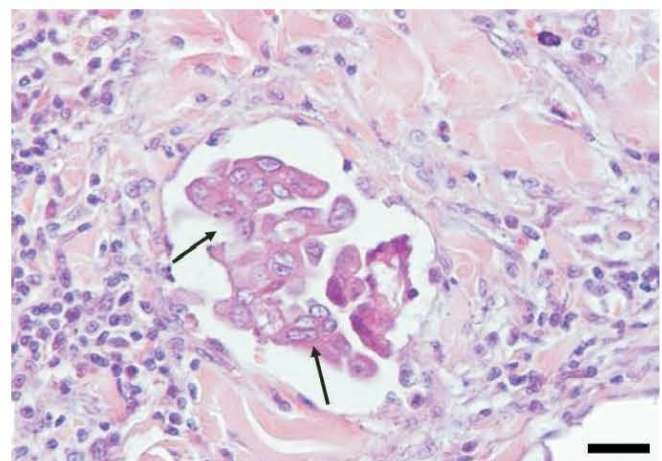


Figura 1. Émbolo neoplásico. En la sección transversal de un vaso linfático mamario de una hembra canina se observa un émbolo neoplásico (flechas) formado por un cúmulo de células morfológicamente similares a las observadas en el tumor primario. Tinción H-E. Objetivo 40x. Barra = 50 µm.

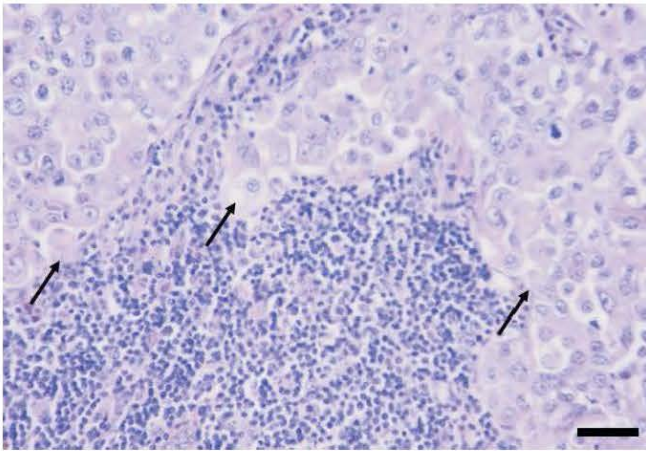


Figura 2. Células tumorales metastásicas. En el linfonódulo inguinal superficial de una hembra canina con carcinoma de mama, pudieron observarse células metastásicas (flechas) con características morfológicas similares a las células del tumor primario. Tinción H-E. Objetivo 40x. Barra = 50 μ m.

probabilidad de hallar un LN+ a partir de una neoplasia con EN frente a una sin EN fue de 9:1. De acuerdo a la prueba del χ^2 la diferencia encontrada entre los grupos que presentaron LN con y sin EN fue altamente significativa ($P < 0,0001$).

Para la identificación de VEGFR2 se observó marcación parda positiva, tanto en células carcinomatosas como en células endoteliales, en todos los casos procesados (Fig. 3).

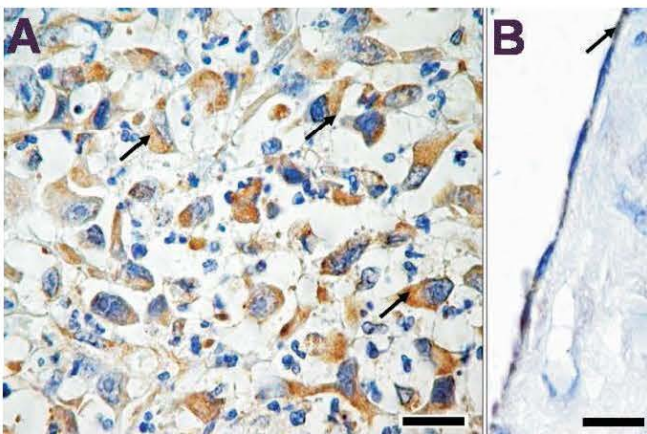


Figura 3. IHQ para la detección de VEGFR2. A. En un corte de un carcinoma mamario simple anaplásico de una hembra canina se observaron células tumorales parduzcas, lo que indica una reacción positiva al anticuerpo anti-*Ftk-1*, ampliamente distribuida en la membrana celular y el citoplasma (flechas). Objetivo 40x. Barra = 50 μ m. B. La misma reacción pudo ser observada en células endoteliales. Objetivo 100x. Barra = 20 μ m.

Cuando se utilizaron técnicas para la identificación de DMV, la marcación fue positiva tanto en microvasos como en células y en grupos celulares, algunos cordonaes (Fig. 4).

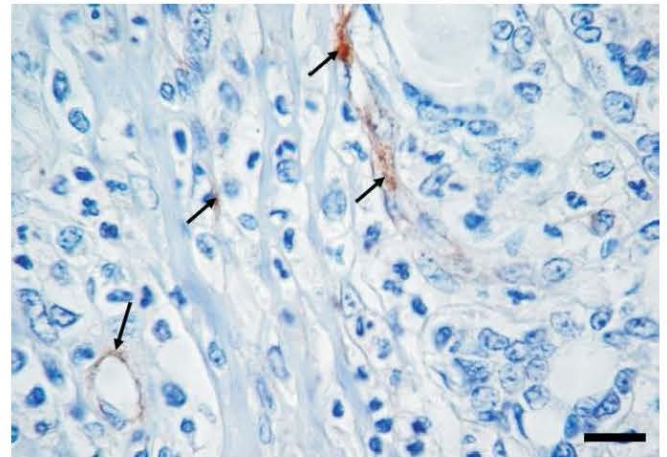


Figura 4. IHQ para la detección de células endoteliales. En un corte de un carcinoma mamario tubular simple de una hembra canina se observaron células parduzcas (reacción positiva) correspondiente a células endoteliales (flechas), cuando el tejido fue incubado con el anticuerpo anti-vWF-1. Esta reacción permitió la posterior determinación de la DMV. Objetivo 40x. Barra = 50 μ m.

En los tumores estudiados se puso en evidencia la significativa asociación entre la expresión del VEGFR-2 y la DMV ($P < 0,015$) (Tablas 1 a 4). En las neoplasias que originaron EN se encontró mayor número de vasos y expresión del VEGFR-2 significativamente más alta que en aquellas en las que no se observó invasión vascular ($P = 0,0001$ para DMV y 0,014 para VEGFR-2). Cuando los estimadores de angiogénesis se consideraron como variables cualitativas (DOI de VEGFR-2 baja/alta, DMV baja/alta, en relación a la mediana) la diferencias significativas se mantuvieron entre EN/VEGFR2 pero no entre EN/DMV.

Tanto la expresión del VEGFR-2 como la DMV (considerada por unidad de superficie) se asociaron estrechamente con la probabilidad de desarrollo de metástasis en el LN ($P < 0,0009$).

Mediante análisis multivariado (regresión logística múltiple por pasos) sólo la presencia de EN y la expresión del VEGFR-2 fueron seleccionadas para la predicción del estado del LN, observando diferencias altamente significativas ($P= 0,007$ y $P< 0,001$, respectivamente). Las variables, valor de la estimación, límites del intervalo de confianza y valores de P se muestran en la Tabla 5.

variable seleccionada	estimación	limite menor (intervalo de confianza, 95 %)	limite mayor (intervalo de confianza, 95 %)	p
EN	0.938	0.252	1.624	0.007
DOI	0.0001	0.000001	0.001	<0.001

Tabla 5. Análisis de regresión logística múltiple por pasos. La presencia de EN y la expresión del VEGFR-2 fueron seleccionadas para la predicción del estado del LN.

DISCUSIÓN

Tanto la frecuencia de neoplasias con EN como la de aquellas con metástasis en los LN se encontraron dentro del rango informado por otros autores (3, 9, 10). Con respecto a la controversial relación entre ambas variables, en este estudio las diferencias encontradas en el hallazgo de metástasis en el LN entre neoplasias con o sin EN fueron de muy alta significación..

En concordancia con otros trabajos, se puso de manifiesto la presencia del VEGFR-2, tanto en células endoteliales como en células carcinomatosas, lo que sugiere la existencia de comunicación auto y paracrina entre las células mencionadas durante los procesos mediados por VEGFR-2 (9, 18, 19, 21).

Se considera que la vía de señalización iniciada por el VEGF y sus receptores es protagónica durante la angiogénesis. Sin embargo, los resultados referidos a la asociación entre la expresión del VEGF y la DMV en tejidos mamarios en caninos son contradictorios (9). Según los resultados obtenidos en este trabajo, la expresión del VEGFR-2 y la de DMV se encuentran

relacionadas. No se hallaron datos publicados con los que contrastar esta observación.

De acuerdo con los análisis realizados en neoplasias de humanos, la mayor DMV estaría relacionada con el hallazgo de EN (7, 13). En las muestras analizadas en este trabajo, tanto la expresión del VEGFR-2 como la DMV fueron proporcionales al número de casos con émbolos, en contraposición a lo informado previamente para los caninos por Millanta y colaboradores (9). Las diferencias pueden atribuirse al número de muestras estudiadas (sólo 29 tumores) y la probabilidad de que las diferencias de hallazgo de EN entre tumores de baja o alta DMV se debieran al azar fue de 0,08.

Es posible especular con una relación causal directa entre la magnitud de la angiogénesis y la presencia de EN, no sólo porque el aumento en el número de vasos podría significar un lecho vascular más amplio para ser invadido, sino, además, porque debido a las características histológicas de los vasos neoformados (lámina basal fragmentada o ausente, células endoteliales con fenestraciones, espacios intercelulares, ausencia de pericitos) éstos son muy permeables, de manera que la activa intravasación de células tumorales es ayudada por estas características estructurales (12). Sin embargo, el hecho de clasificar un caso particular como de DMV baja o alta no permitiría realizar ninguna especulación con respecto a una posible embolización no detectada en los cortes en estudio y, por lo tanto, no tendría mayor utilidad que la realización de mayor número de cortes.

Con respecto a la vía VEGF/VEGFR, el receptor VEGFR-2, cuya expresión se analizó en el presente

del GF en proliferación, invasión, migración y supervivencia de células endoteliales y carcinomatosas, actividades que propenden al desarrollo de metástasis. Según Nakopoulou (19), no se ha establecido relación entre la expresión del VEGFR-2 y el hallazgo de metástasis o el tiempo de supervivencia. En el presente trabajo, la mayor expresión del VEGFR-2 se asoció fuertemente con mayores probabilidades de desarrollo de metástasis en el LN.

La magnitud de la vascularización tumoral se ha relacionado en numerosos estudios de medicina humana con factores de reconocido valor pronóstico, como el hallazgo de metástasis en el LN e incluso el tiempo de supervivencia global (11, 13). De los resultados aquí presentados se infiere una asociación estrecha entre la cantidad de vasos, expresada en cantidad de vasos por unidad de superficie, y la contingencia de su invasión y establecimiento de metástasis en los LN de las perras afectadas.

La supervivencia de las perras portadoras de éstas neoplasias puede estimarse asertivamente mediante el hallazgo de metástasis en los LN satélites. Sin embargo, ante la eventualidad de la remisión de la neoformación primaria como única muestra se vuelve imperioso el estudio, caracterización y ponderación de parámetros propios de la masa tumoral. En ese contexto, la asociación evidenciada entre el hallazgo de EN, la angiogénesis y el estado del LN adquieren relevancia en el momento de emitir el pronóstico y tomar decisiones terapéuticas en las perras con carcinomas mamarios.

La determinación de la magnitud de la angiogénesis medida por la expresión del VEGFR-2 y la DMV, aunque no estandarizada en los laboratorios de patología veterinaria, constituye una valiosa herramienta para estimar la progresión de la

enfermedad. La evaluación de la invasión vascular y su inclusión rutinaria en los informes anatomopatológicos, de probada factibilidad, se vuelven necesarias en virtud del aporte que pueden constituir para los médicos veterinarios actuantes en los casos clínicos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la asistencia técnica de las Hts. C Aralda y L Díaz.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sorenmo K. (2003). Canine mammary gland tumors. *Vet Clin Small Anim*; 33: 573-596.
2. Misdorp W, Else RW, Hellmén E, Lipscomb TP. (1999). Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat. 2ª serie. Vol VII. Washington: AFIP. USA.
3. Itoh T, Uchida K, Ishikawa K, Kushima K, Kushima E, Tamada H *et al.* (2005). Clinicopathological survey of 101 canine mammary gland tumors: differences between small-breed dogs and others. *J Vet Med Sci*; 67 (3): 345-347.
4. Sleeman JP. (2000). The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res*; 157: 55-81.
5. Greene FL, Page DL, Fleming ID (eds.) Fritz A, Balch CM. (2002). AJCC Cancer Staging Handbook. Parte VII. 6ª edición. New York: Springer Verlag. USA.
6. Westened PJ, Meurs CJC, Damhuis RAM. (2005). Tumor size and vascular invasion predict distant metastasis in stage I breast cancer. Grade distinguishes early and late metastasis. *J Clin Pathol*; 58: 196-201.
7. Kato T, Kameoka S, Kimura T, Nishikawa T, Kobayashi M. (2003). The combination of angiogenesis and blood vessel invasion as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer*; 88:1900-1908.
8. Cullen JM, Page R, Misdorp W. (2002). An overview of cancer pathogenesis, diagnosis and management. En: Meuten DJ. Tumors in Domestic Animals. 4ª ed. Ames: Iowa State University Press, pp. 3-36.
9. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D *et al.* (2006). The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Res Vet Sci*; 81: 350-357.
10. Chang S, Chang C, Chang T, Wong M. (2005). Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (8-2002). *JAVMA*; 227 (10): 1625-1629.
11. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. (2005). Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathol*; 46: 481-489.
12. Guinebretière JM. (2005). Angiogenesis and breast neoplasms. The pathologist point of view. *Gynécolog Obstét Fertil*; 33: 140-146.
13. Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res*; 64: 2941-2955.
14. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*; 54: 53-61.
15. Parikh AA, Ellis LM. (2004). The vascular endothelial growth factor family and its receptors. *Hematol Oncol Clin N Am*; 18: 951-971.
16. Hicklin DJ, Ellis LM. (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*; 23 (5): 1011-1027.
17. Schoeffner DJ, Matheny SL, Akahane T, Factor V, Berry A, Merlino G *et al.* (2005). VEGF contributes to mammary tumor growth in transgenic mice through paracrine and autocrine mechanisms. *Lab Invest*; 85: 608-623.
18. Nakopoulou L, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Gakiopoulou-Givalou H *et al.* (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1 in breast carcinomas: correlation with proliferation. *Hum Pathology*; 33 (9): 863-869.
19. Restucci B, Borzacchiello G, Maiolino P, Martano M, Paciello O, Papparella S. (2004). Expression of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1 in canine mammary tumours. *J Comp Path*; 130: 99-104.
20. Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N, de Rinaldis E. (2009). Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*; 10: 135-155.
21. Restucci B, Papparella S, Maiolino P, De Vico G. (2002). Expression of vascular endothelial growth factor in canine mammary tumors. *Vet Pathol*; 39 (4): 488-493.