

# **Neoplasias melanocíticas en caninos: evaluación de marcadores inmunohistoquímicos que contribuyen a la formulación del diagnóstico y del pronóstico**

**Méd. Vet. Cuitiño, María Cecilia**

Cátedra de Patología Especial

Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP

[mccuitino@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mccuitino@fcv.unlp.edu.ar)

**Director: Dr. Julio R Idiart. Codirectora: Dra. Adriana R Massone**

## **Resumen**

Las neoplasias melanocíticas (NM) constituyen un grupo de tumores compuestos por células productoras de pigmento melánico que pueden ocurrir tanto en animales como en el hombre. Dichas neoplasias son relativamente comunes en caninos, representando entre el 4 y el 7% del total de los tumores en general. Los sitios más comúnmente afectados son la mucosa oral, los labios, la piel (especialmente de los dedos) y, en menor medida, el ojo. En años recientes se ha observado un continuo aumento en la incidencia de NM en el hombre en todo el mundo. Considerando que los animales de compañía se encuentran expuestos a los mismos factores ambientales que sus propietarios, dicho incremento promueve el interés por el estudio de estos tumores en medicina veterinaria. La frecuente carencia de pigmento y el grado de pleomorfismo celular de las NM plantean grandes inconvenientes en el diagnóstico y, sobre todo, en el pronóstico. Las investigaciones propuestas aportarán conocimientos tendientes a resolver dichas dificultades a través del estudio y aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. En este trabajo se presentan resultados preliminares acerca de la expresión de melan A, proteína S100 y vimentina en NM primarias y metastásicas caninas, a fin de aplicar dichos anticuerpos al diagnóstico certero de NM amelanóticas e indiferenciadas.

**Palabras claves:** neoplasias melanocíticas, caninos, inmunohistoquímica, diagnóstico, pronóstico.

## **Introducción**

En las últimas décadas, la medicina veterinaria ha logrado reducir la mortalidad asociada a las enfermedades infecciosas de los animales de compañía. Es por ello que el promedio de vida de los mismos se ha prolongado considerablemente. En consecuencia, las enfermedades llamadas de la “edad avanzada”, dentro de las cuales se incluyen las neoplásicas, han adquirido una particular importancia. Así, la oncología veterinaria ha surgido como una disciplina compleja y de interés creciente. Las neoplasias melanocíticas (NM) constituyen un grupo de tumores compuestos por células productoras de pigmento melánico que pueden ocurrir tanto en animales como en el hombre. Generalmente se presentan como neoplasias cutáneas, orales y oculares. Los NM en caninos son relativamente comunes, representando entre el 4 y el 7% del total de los tumores en general. Se presentan con mayor frecuencia en caninos mayores de 10 años de edad (rango de 1 a 17) (1, 2). La frecuencia de NM es más alta en animales de piel y mucosas pigmentadas (1, 2, 3). No ha sido observada predisposición por sexo, aunque algunos autores afirman que, al igual que en humanos, la proporción de machos y hembras afectados es de 2-3:1 (1, 2, 4). Los sitios más comúnmente afectados son, en orden decreciente, la mucosa oral, los labios, la piel (especialmente de los dedos) y, en menor medida, el ojo (1). Existen contradicciones al respecto ya que otros autores afirman que el mayor porcentaje de estas neoplasias ocurre en la piel (5). En la mucosa oral las localizaciones más comunes son las encías, el paladar y los labios (incluyendo la unión mucocutánea) (1, 2, 6), mientras que en la piel lo son la cara (especialmente los párpados), el tronco y las extremidades (sobretudo los dedos y el lecho ungueal) (1, 3, 6). En años recientes se ha observado un continuo aumento en la incidencia de NM en el hombre en todo el mundo. Considerando que los animales de compañía se encuentran

expuestos a los mismos factores ambientales que sus propietarios, dicho incremento promueve el interés por el estudio de estos tumores en medicina veterinaria (5). Como resultado de una revisión del material de archivo de la Cátedra de Patología se observó un incremento en el diagnóstico de procesos tumorales caninos durante el transcurso de los últimos veinte años (1987-2006). En el período 1987-1996 se diagnosticaron 360 neoplasias cutáneas y 49 neoplasias orales mientras que dichas cantidades prácticamente se triplicaron en los diez últimos años (1997-2006), alcanzando un total de 1145 y 160 casos, respectivamente. Las NM cutáneas representaron, aproximadamente, entre el 5 y el 6% de los tumores de piel, independientemente del período analizado. Las NM orales representaron el 12% de las neoplasias orales en los primeros años y el 22% de las mismas en los últimos diez años.

En el pasado, el término “melanoma” ha sido empleado de diferentes formas en los sistemas de nomenclatura de las NM caninas. Actualmente, de acuerdo con la descripción y clasificación propuesta por la OMS, las NM malignas son denominadas melanomas y las NM benignas melanocitomas (7, 8). La diversidad de tipos histopatológicos observada en NM caninas es menor que la descrita en la literatura médica. No obstante, ciertas características de las NM caninas, como la frecuente carencia de pigmento y el pleomorfismo celular, plantean dificultades en el diagnóstico; la identificación de NM benignas, malignas e indiferenciadas mediante estudios histopatológicos convencionales resulta compleja. Las investigaciones propuestas aportarán conocimientos tendientes a resolver dichas dificultades a través de la evaluación de la expresión de antígenos mediante las técnicas de inmunohistoquímica con el objetivo de contribuir a la formulación del diagnóstico y establecer parámetros de valor diagnóstico.

## **Desarrollo**

Como parte de las actividades propuestas, se realizó la estandarización de la técnica de inmunohistoquímica para el estudio de la expresión de melan A, proteína S100 y vimentina en NM primarias y metastásicas caninas, a fin de aplicar dichos anticuerpos al diagnóstico de NM amelanóticas e indiferenciadas. A continuación se exponen los resultados más relevantes de dicho trabajo.

## **Expresión de melan A, proteína S100 y vimentina en neoplasias melanocíticas primarias y metastásicas caninas**

### **Introducción**

Los marcadores inmunohistoquímicos utilizados de rutina para la identificación de NM amelanóticas e indiferenciadas son vimentina y proteína S100 (9, 10). Melan A es una proteína que se expresa en el citoplasma de melanocitos, al contrario de los que sucede con los marcadores antes citados, su distribución en otros tejidos es escasa. En medicina veterinaria se han comunicado resultados variables de su expresión en NM (2, 9). El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de melan A, proteína S100 y vimentina en NM primarias y metastásicas en caninos.

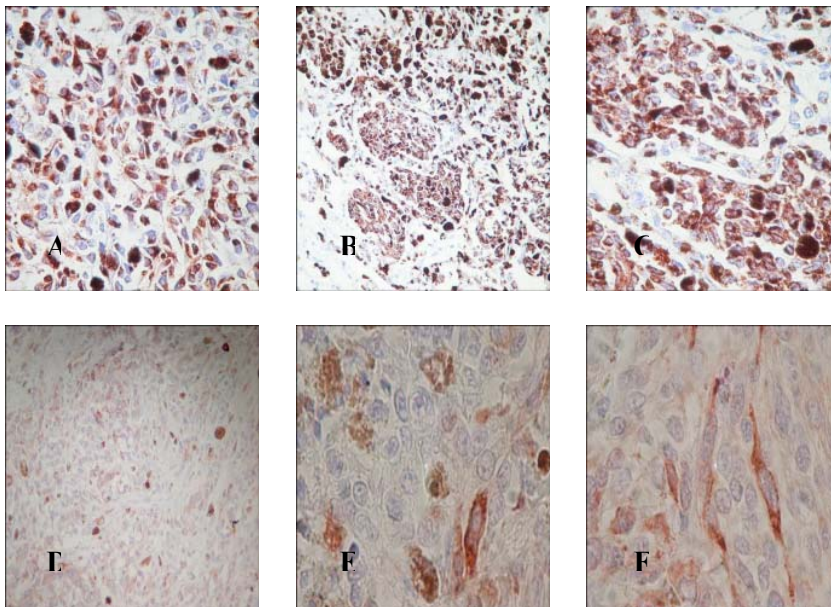
### **Materiales y métodos**

Se realizó una revisión de casos aplicando la clasificación propuesta por la OMS (1998). Fueron incluidas 6 NM orales, 15 NM cutáneas, 2 NM oculares y 5 metástasis pulmonares correspondientes a 4 NM orales y 1 NM cutánea de las antes citadas. El grado de pigmentación se cuantificó de 0 a 4. Se utilizaron los anticuerpos anti melan A (RTU-Melan A, clon A 103, Novocastra), anti proteína S100 (RTU-S100p, rabbit

polyclonal, Novocastra) y anti vimentina (RTU-VIM-V9, Novocastra), y el *kit* de detección *LSAB2*® System HRP (Dako Cytomation) con revelado mediante diaminobencidina (DAB, SK-4800, Vector). Se evaluaron los siguientes características de la inmunomarcación: distribución (homogénea, heterogénea), intensidad (fuerte, moderada, débil), localización celular (citoplasmática, nuclear, ambas) y patrón celular de la reacción (difuso, polar, ambos). En el caso de melan A se observó la relación de la inmunorreactividad con el tipo celular predominante y el grado de pigmentación del tumor.

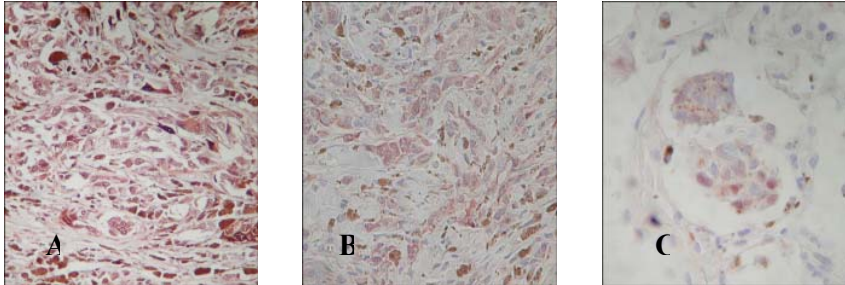
### Resultados y discusión

Diecisiete de 23 NM primarias (74%) y 4 de 5 metástasis (80%) fueron positivas a melan A (fig. 1). La metástasis negativa correspondió a una NM primaria positiva. De las 17 NM primarias, 13 (76,5%) mostraron marcación heterogénea y 4 (23,5%) homogénea (fig. 1 A, B, D). Se observó intensidad fuerte en 11 casos (65%), moderada en 4 (23%) y débil en 2 (12%) (fig. 1). Todos los tipos celulares, independientemente de su grado de melanización, mostraron positividad a melan A (fig. 1 A y D). Los melanófagos fueron negativos (fig. 1 B, D y E). La marcación fue citoplasmática, exhibiendo patrón difuso 9 neoplasias (53%), polar 4 (23,5%) y ambos patrones 4 (23,5%) (fig. 1). Las características de la inmunomarcación en las metástasis fueron similares a las observadas en las neoplasias primarias (fig. 1 B y C). La intensidad de marcación en las primeras fue variable en relación a las segundas. Asimismo, en la mayor parte de los casos, se apreciaron variaciones entre ambas en la distribución de la marcación y en el patrón citoplasmático de reacción. Once de 13 NM malignas (85%) y 6 de 10 NM benignas (60%) fueron positivas a melan A. De las NM con grados de pigmentación 3 y 4, el 85% fue positivo, mientras que de las NM con grados de 0 a 2, el 60% fue positivo. De entre las últimas, 3 de 5 NM amelanicas (60%) fueron negativas.



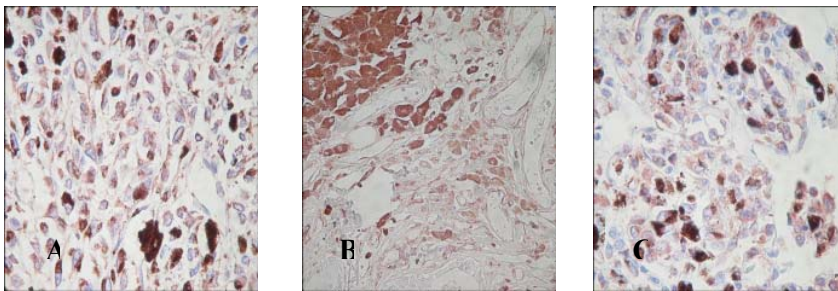
**Figura 1.** Inmunopositividad a melan A. A: NM primaria, tipo celular mixto, melanización grado 4, marcación homogénea, fuerte, patrón citoplasmático polar (obj. 100x). B: metástasis pulmonar de A, marcación heterogénea, patrón citoplasmático mixto, melanófagos negativos (obj. 40x). C: detalle de B (obj. 100x). D: NM primaria, tipo celular mixto, melanización grado 3, marcación homogénea, fuerte, patrón citoplasmático difuso, melanófagos negativos (obj. 40x). E-F: detalle de D, marcación citoplasmática difusa, fuerte (obj. 100x).

Veintidós de 23 NM primarias (96%) y 4 de 5 metástasis (80%) fueron positivas a proteína S100 (fig. 2). La metástasis negativa también lo fue a melan A. En todos los casos la marcación fue citoplasmática y nuclear difusa y, en la mayoría de ellos, la intensidad fue moderada/fuerte (fig. 2). La distribución fue homogénea en apenas más de la mitad de los casos. Todas las NM amelánicas fueron positivas a proteína S100.



**Figura 2.** Inmunopositividad a proteína S100. A: NM primaria, tipo celular mixto, melanización grado 3, marcación homogénea, fuerte, patrón citoplasmático y nuclear difuso (obj. 40x). B: NM primaria, tipo celular mixto, melanización grado 3, marcación homogénea, fuerte, patrón citoplasmático y nuclear difuso (obj. 40x). C: metástasis pulmonar de B (obj. 100x).

El 100% de las NM estudiadas, incluyendo las metástasis, fue positivo a vimentina (fig. 3). La distribución de la marcación fue homogénea y la intensidad moderada/fuerte en la mayoría de casos, inclusive en NM amelánicas (fig. 3). Se observó reactividad citoplasmática generalmente difusa (fig. 3). A excepción de las intensidad de marcación, las características de la inmunomarcación de proteína S100 y vimentina se mantuvieron relativamente constantes entre las metástasis y la neoplasia primaria correspondiente (fig. 2 C y fig. 3 C).



**Figura 3.** Inmunopositividad a vimentina. A: NM primaria, tipo celular mixto, melanización, grado 4, marcación homogénea, fuerte, patrón citoplasmático difuso (obj. 40x). B: NM primaria, tipo celular mixto, melanización grado 4, marcación homogénea, moderada, patrón citoplasmático difuso (obj. 40x). C: metástasis pulmonar de B (obj. 100x).

Diecisiete de 23 (74%) NM primarias y 3 de 5 (60%) metástasis fueron positivas a los tres antígenos estudiados. De las 6 NM primarias negativas a melan A, 5 (3 amelánicas entre ellas) fueron positivas a proteína S100 y vimentina. Sólo una fue también negativa a proteína S100. Las 2 metástasis negativas, una a proteína S100, y otra a melan A, fueron positivas a los otros dos antígenos estudiados. La mayor parte de los resultados de la expresión de melan A, proteína S100 y vimentina coincide con lo descrito en la bibliografía (2, 9)

## **Conclusión**

Se concluye que la inmunomarcación de melan A podría contribuir al diagnóstico de NM caninas de distintas localizaciones. No obstante, en NM amelánicas, la evaluación de proteína S100 resultaría indispensable, debido al bajo número de éstas que resulta positivo a melan A.

## **Bibliografía**

- 1) Smith SH, Goldschmidt MH, McManus PM. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 2002; 39: 651-678.
- 2) Ramos-Vara JA, Beissenherz ME, Miller MA, Johnson GC, Pace LW, Fard A *et al.* Retrospective study of 338 canine oral melanomas with clinical, histologic, and immunohistochemical review of 129 cases. *Vet Pathol* 2002; 37: 597-608.
- 3) Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. *Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis*. 2<sup>nd</sup> ed. Iowa: Blackwell Science, 2005.
- 4) Hernández SZ, Negro VB, Duchene A, Cattaneo ML. Neoplasias orales en caninos: Descripción epidemiológica de 73 casos. *InVet* 1999; 1: 61-66.
- 5) 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* 1999; 121:13-24.
- 6) Goldschmidt MH, Hendrick MJ. Tumors of the Skin and Soft Tissues. En: Meuten DJ, editor. *Tumors in Domestic Animals*. 4<sup>th</sup> ed. Iowa: Iowa State Press, 2002: 78-83.
- 7) Goldschmidt MH, Dunstan RW, Stannard AA, von Tscharner C, Walder EJ, Yager JA. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. Washington: AFIP, 1998: 38-40.
- 8) Wilcock B, Dubielzig RR, Render JA. WHO International Histological Classification of Tumors of Domestic Animals. Second Series. Washington: AFIP, 1998: 14-16, 18-19, 22-24.
- 9) Koenig A *et al.*: Expression of S100a, vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol* 38:427-435, 2001.
- 10) Orchard GE: Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 32:475-481, 2000.